



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA E HEMATOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**SUELEN DOS SANTOS SCHMITT**

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR (PrP<sup>c</sup>)  
E DE SEU LIGANTE, A FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE  
DO TIPO 1 (STI1), NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO  
DA CRISTA NEURAL TRUNCAL, *IN VITRO***

FLORIANÓPOLIS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise da influência da proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) e de seu ligante, a fosfoproteína induzida por estresse do tipo 1 (STI1), na diferenciação das células-tronco da crista neural truncal, *in vitro*

**Trabalho de Conclusão de Curso**  
(Estágio II – BIO 5156)

**ACADÊMICA:** Suelen dos Santos Schmitt  
Ciências Biológicas, 10ª fase

**ORIENTADOR:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Gonçalves Trentin  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - UFSC  
Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular

**CO-ORIENTADOR:** Dr. Ricardo Castilho Garcez  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Florianópolis, Novembro de 2009.

---

Assinatura do(a) acadêmico(a)

---

Assinatura do(a) Orientador(a)

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR (PrP<sup>C</sup>) E DE SEU LIGANTE, A FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE DO TIPO 1 (STI1), NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DA CRISTA NEURAL TRUNCAL, *IN VITRO*

Suelen dos Santos Schmitt

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margherita Anna Antonia Maria Barracco (Membro Titular)

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

---

Msc. Bruno Costa da Silva (Membro Titular)

Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

---

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni (Membro Suplente)

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Florianópolis, 20 de Novembro de 2009.

*Dedico em especial este trabalho ao meu querido co-orientador Ricardo,  
que abriu as portas e a minha mente para esse incrível mundo da ciência.*

*"Fale, e eu esquecerei; Ensine-me, e eu poderei lembrar;  
Envolve-me, e eu aprenderei."*

(Benjamin Franklin)

*"É melhor tentar e falhar,  
que se preocupar e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que se sentar fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
a em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
a em conformidade viver ..."*

(Martin Luther King)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Andréa, pela oportunidade que me deu ao me aceitar no laboratório, por propiciar minha iniciação no mundo científico, pelo apoio e incentivo dados, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Ao meu querido, paciente, fervoroso, inteligente e amigo co-orientador Ricardo por ter me acolhido após eu ter sido rejeitada (desculpa Cláudia, não pude perder a piada!! Rsrtrs). Obrigada pelo tempo dedicado a esclarecer todas as minhas dúvidas, a me ensinar tudo o que aprendeu no laboratório, por acreditar e ter fé em mim e pelo estímulo todos os dias. Obrigada pela amizade e preocupação, pelo telefonema da França quando eu estava no hospital. Obrigada por ter feito a diferença na minha vida acadêmica e pelos ensinamentos que eu vou levar pra vida. São pessoas como você, apaixonadas e dedicadas, que fazem com que outras tenham gosto por aprender.

A todo o pessoal do laboratório: Bi, pela amizade pura e simples, por ser uma pessoa transparente que eu amo e admiro muito; Talita, pela amizade, pelo colchão na sala, pela casa bagunçada ou não, pelos cardápios variados, pelo bolo de capuccino que nunca vai existir, pelo exemplo de caráter e de profissional, por tornar a minha vida mais feliz; Zucco, pelas companhias no fluxo, pelos pensamentos impróprios em horas impróprias, por acompanhar “a desgraça dos endorfes” que rendeu uma das melhores gargalhadas da minha vida, pelos passeios de carro com muita emoção, pelos momentos tocantes quando estamos com TPM, enfim, por ser minha amiga; Bia, pelas várias taças de champagne que eu tomei no seu casamento, pela despedida de solteira (opss... brincadeira!), por ser vocalista e/ou back vocal da nossa banda, por deixar que eu faça parte da sua vida, por ser minha amiga do coração; New, por ser um rapax bom (desculpa Bi-k, tive que imitar!), super prestativo, pela lanterna, pelos convites de festas suuuper legais deixadas na porta do meu armário, por proporcionar um dos porres da minha vida, por tornar meus dias mais divertidos; Ciça, pelos lanches do Mc Donald’s, pelos doces fora de hora, pelo exemplo de pessoa, pelas risadas, pela amizade; Fernanda, por ter aceitado de coração o desenho que eu fiz pra ela, pela irritação divertida; Mari, pelo “bom-dia” sempre acompanhado de um sorriso; e

a todos os meus outros amigos Aloísio, Ana, Bruna, Denise, Diego, Ezequiel, Giordano, Meline (que está de volta), Raul, Sarah, Sílvia, por fazerem parte do meu dia-a-dia e da minha vida. Aos que não estão mais no laboratório, mas por quem possuo uma enorme amizade: Bi-k, sua extorva, obrigada por eu não ter deixado de sorrir nem um dia sequer quando você estava presente, por ser essa amiga maluquinha que eu amo; Bruno, obrigada pelos bate-papos, pelos conselhos, por corrigir meu projeto de TCC, por aceitar meu convite e vir de São Paulo para a minha banca, pelo exemplo pessoa que vai atrás dos seus objetivos, pela amizade; Cláudia, pelo meu primeiro cigarro, por se arrepender de ter me rejeitado, por me compensar sendo a amiga maravilhosa que você é.

Ao pessoal do laboratório vizinho: Pri, por ser uma companheira maravilhosa de viagem, de trabalho (Hi! Good morning! Welcome to Legends!) de quarto (What's the difference between..... rrsrs), de porre (Get out of here!) e de muuuuuitas risadas; Liege, Paula e Pedro, por todas as gargalhadas juntos.

Ao Tiago Goss, por ter preparado e nos enviado todo o material referente à proteína príon e por tirar as minhas dúvidas prontamente. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma R. Martins por ter gentilmente nos doado este material.

Aos grandes professores, dos quais eu tive o imenso prazer e privilégio de ser aluna, Margherita Barracco, Paulo Hofmann, Daniela de Toni, Paulo Simões Lopes, Edmundo Carlos de Moraes, Gustavo Caponi, Ademir Reis, que são exemplos de profissionais, que têm paixão pelo que fazem e transmitem isso aos alunos.

Aos meus amigos de graduação que vão ficar para o resto da vida, Dai, Nana, May, Elis, Lu, Clara, Alê, Kenny, Mari, Luli, Elaine, Japa, Jonatan, André, Tici, obrigada por entrarem na minha vida e fazerem parte dela.

Às minhas amigas de infância, que são a família que eu escolhi, que eu amo de todo o coração, que são a razão de eu viver, Rafa, Nica e Lice (saudades imensas!!!).

Aos melhores pais do mundo, Antônio e Rosane, pelo amor sem medida, pela dedicação, doação, apoio, puxões de orelha, conselhos em todos os momentos da minha vida. Agradeço infinitamente por tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim. Às minhas irmãs, Sabrina e Simone, e meu cunhado, Fábio, pelo amor, amizade e paciência.

Ao CNPq, MCT/INFRA, PRONEX/CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro para a realização desse trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1. A Crista Neural .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1.1. Indução e Migração das Células da CN .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1.2. Diferenciação e Multipotencialidade das Células da CN .....</b>	<b>05</b>
<b>1.2. A Proteína Prion Celular .....</b>	<b>09</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Animais .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Cultura de células da CNT de codornas .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Tratamento das culturas celulares com PrP<sup>c</sup>, STI1 ou         pepSTI1<sub>230-245</sub> .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Imunocitoquímica e identificação fenotípica .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5. Análise estatística .....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Expressão de PrP<sup>c</sup> e de STI1 nas células da CNT .....</b>	<b>20</b>

<b>4.2. Efeitos dos tratamentos com PrP<sup>c</sup>, STI1 e pepSTI<sub>230-245</sub> na fase de migração das células da CNT .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.1. Análise do fenótipo glial .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.2. Análise do fenótipo neuronal .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.3. Análise do fenótipo melanocítico .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2.4. Análise do fenótipo muscular liso .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3. Efeitos dos tratamentos com PrP<sup>c</sup>, STI1 e pepSTI<sub>230-245</sub> na fase de diferenciação das células da CNT .....</b>	<b>29</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 01:</b> Etapas da formação da crista neural .....	03
<b>Tabela 01:</b> Anticorpos primários utilizados para os diferentes tipos celulares analisados .....	18
<b>Figura 02:</b> Esquema da migração das células da CN da região truncal .....	04
<b>Tabela 02:</b> Relação dos anticorpos secundários utilizados .....	18
<b>Figura 03:</b> Mapa do destino dos fenótipos derivados da CN ao longo do eixo antero-posterior <i>in vivo</i> .....	06
<b>Figura 04:</b> Representação esquemática dos vários progenitores identificados por análises clonais <i>in vitro</i> das células da CN .....	07
<b>Figura 05.</b> Ligantes de PrP <sup>c</sup> envolvidos com atividade neurotrófica .....	12
<b>Figura 06.</b> Procedimento para retirada do tubo neural e obtenção das células da CNT .....	15
<b>Figura 07.</b> Esquema dos períodos de tratamento das células da CNT .....	16
<b>Figura 08.</b> Análise da expressão de PrP <sup>c</sup> e de STI1 nas células da CNT ....	20
<b>Figura 09.</b> Análise do fenótipo glial sobre a influência de PrP <sup>c</sup> , STI1 e pepSTI1 <sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura .....	22
<b>Figura 10.</b> Análise do fenótipo neuronal sobre a influência de PrP <sup>c</sup> , STI1 e pepSTI1 <sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura .....	24
<b>Figura 11.</b> Análise do fenótipo melanocítico sobre a influência de PrP <sup>c</sup> , STI1 e pepSTI1 <sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura .....	26

<b>Figura 12.</b> Análise do fenótipo de músculo liso sobre a influência de PrP <sup>c</sup> , STI1 e pepSTI1 <sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura .....	28
<b>Figura 13.</b> Modelo de linhagens celulares da CNT sobre a influência de PrP <sup>c</sup> e de STI1 .....	33

## RESUMO

A crista neural (CN) é uma estrutura embrionária capaz de originar grande variedade de tipos celulares, incluindo neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, células adrenomedulares, melanócitos, cartilagem e ossos da cabeça. A proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) é uma glicoproteína de superfície celular ancorada a glicosilfosfatidilinositol abundantemente expressa no sistema nervoso, em vários componentes celulares do sistema imune e em muitos outros órgãos e tecidos. Muitas das funções relacionadas à PrP<sup>c</sup> dependem da sua ligação com outras moléculas, como, por exemplo, a fosfoproteína induzida por estresse do tipo 1 (STI1). A ligação de PrP<sup>c</sup> com algumas proteínas está associada a vários fenômenos celulares distintos, como neuritogênese, diferenciação neuronal, renovação de células-tronco hematopoiéticas, proteção contra estresse oxidativo, entre outros. As células da CN são altamente responsivas a elementos do microambiente como fatores solúveis e proteínas de matriz extracelular. Desta forma, surgiu o interesse em investigar a influência de PrP<sup>c</sup> e do seu ligante STI1 na diferenciação das células tronco da CN da região truncal (CNT). Neste trabalho mostramos que as células da CNT expressam tanto PrP<sup>c</sup> quanto STI1 e cerca de 90% das células mantêm essa expressão até o sexto dia de cultura. Além disso, realizamos experimentos onde as células da CNT de embriões de codorna foram tratadas com PrP<sup>c</sup>, STI1 ou com o peptídeo pepSTI1<sub>230-145</sub> (que contém somente a região de STI1 que interage com PrP<sup>c</sup>) durante as primeiras 24 horas de cultura (período em que as células da CNT migram do tubo neural). Após 5 dias de cultura, as células foram analisadas por imunofluorescência usando marcadores específicos para neurônios, células gliais, músculos lisos e melanócitos. Nossos resultados mostraram que todos os tratamentos foram capazes de aumentar a proporção de neurônios (cerca de 10 vezes após o tratamento com PrP<sup>c</sup>, 5 vezes com STI1 e 5 vezes com pepSTI1<sub>230-245</sub>). Os mesmos tratamentos promoveram uma diminuição de cerca de 3 vezes na proporção de células gliais e um ligeiro aumento (2 vezes) na proporção de melanócitos. Nossos resultados demonstram que PrP<sup>c</sup> e STI1 estimulam a neurogênese em detrimento da gliogênese. Além disso, o tratamento com pepSTI1<sub>230-245</sub> apresentou resultados semelhantes aos de STI1, sugerindo que o efeito de STI1 sobre a diferenciação das células da CNT deva estar ocorrendo pela interação com PrP<sup>c</sup> endógeno das células da CN. Estes resultados são inéditos e sugerem que PrP<sup>c</sup> e STI1 têm um importante efeito na diferenciação das células da CNT e um potencial papel no desenvolvimento do sistema nervoso periférico.

Palavras-chave: crista neural, diferenciação celular, PrP<sup>c</sup>, STI1.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A Crista Neural**

A Crista Neural (CN) é uma estrutura embrionária que surge em embriões de craniatas (Holland & Graham, 1995) e tem origem a partir do neuroepitélio. Durante a neurulação, a placa neural se dobra e as extremidades laterais se fundem formando o tubo neural que dará origem ao sistema nervoso central (SNC). No momento do fechamento do tubo neural, as células localizadas nas pregas neurais sofrem uma transição do fenótipo epitelial para o mesenquimal, tornam-se migratórias e povoam vários órgãos e tecidos embrionários, seguindo caminhos migratórios específicos e são as responsáveis pela produção de uma grande variedade de tipos celulares do organismo adulto (LeDouarin *et al.*, 1993; LeDouarin & Kalcheim, 1999) (Figura 01).

A CN tem atraído a atenção dos embriologistas e evolucionistas há quase 150 anos como um modelo para estudo de indução e especificação embrionária, comprometimento tecidual, potencial migratório e determinação do destino celular (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008). Considerada uma sinapomorfia dos craniatas e algumas vezes referida como a quarta camada germinativa, a CN é fundamental para os vertebrados e os coloca à parte de todos os outros metazoários, pois ela representa um grande passo evolutivo que permitiu aos vertebrados o desenvolvimento da cabeça (Gans & Northcutt, 1983; Hall, 2000).

#### **1.1.1. Indução e Migração das Células da CN**

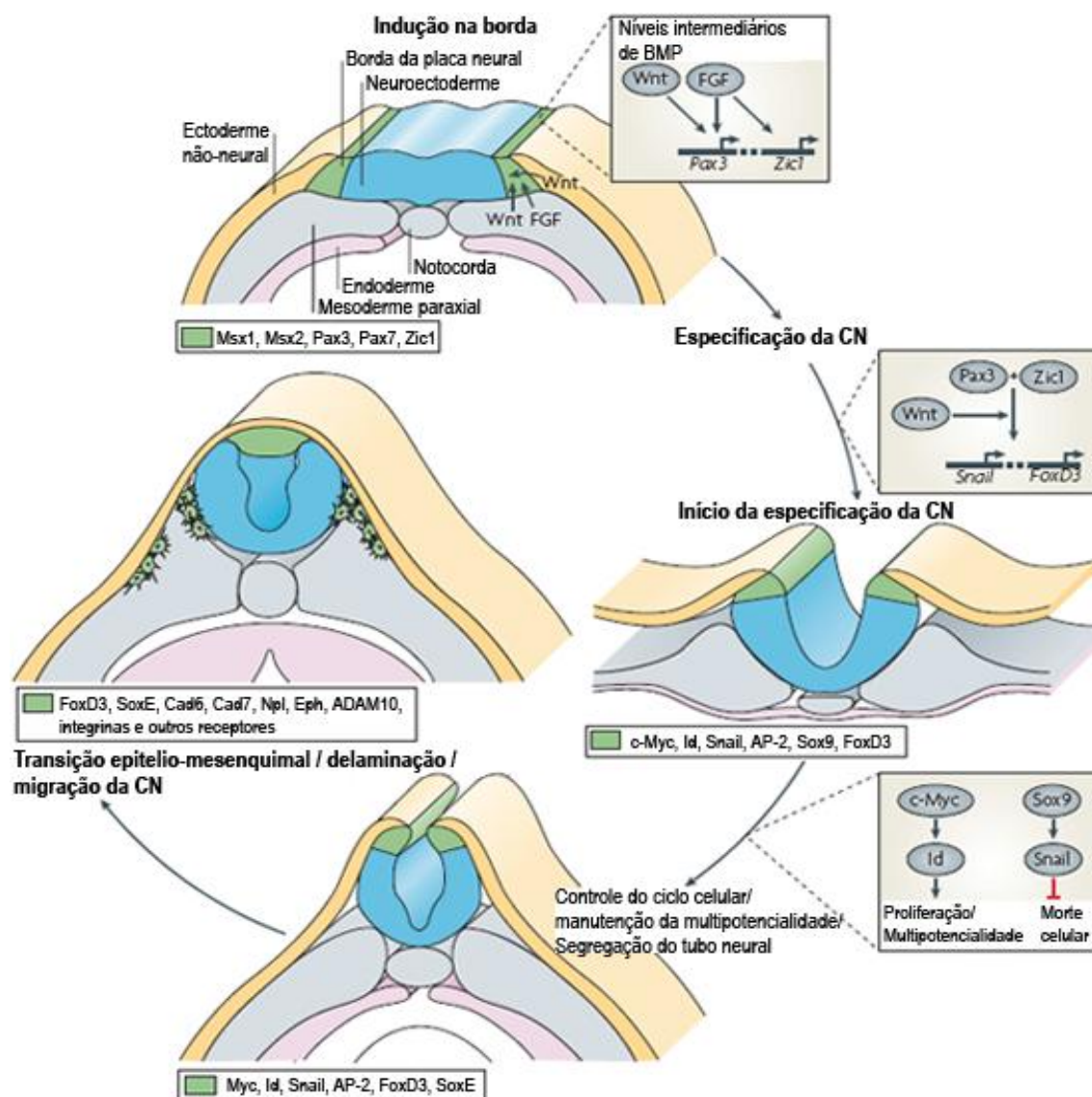
A CN presuntiva é induzida primeiramente por um conjunto de eventos sinalizadores que interagem entre o neuroepitélio, o ectoderma não-neural e o mesoderma paraxial. Essa indução envolve vias de sinalização e fatores de transcrição como, por exemplo, Wnts (proteínas wingless-Int), BMPs (proteínas morfogenéticas de osso), TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral  $\beta$ ) e FGFs (fatores de crescimento de fibroblasto), entre outros (Meulemans & Bronner-Fraser, 2004) (Figura 01). Estudos com aves mostraram que a sinalização

Delta-Notch é necessária para aumentar a expressão de BMP e promover a formação da CN, restringindo a CN à borda da placa neural (Endo *et al.*, 2002). Além disso, García-Castro e colaboradores (2002) demonstraram que a sinalização de Wnt é tanto necessária quanto suficiente para a indução da CN. Porém, evidências recentes sugerem que a indução da CN inicia muito antes do que se pensava. Através de experimentos com embriões de aves, Basch e colaboradores (2006) mostraram que a CN presuntiva é especificada já no estágio de gástrula, antes mesmo de existir um ectoderma neural e não-neural. Ezin e colaboradores (2009) confirmaram essas evidências mostrando que, durante a gastrulação, um grupo de células da CN presuntiva expressando tanto BMP4 quanto Pax7 localiza-se lateralmente, distante do mesoderma que está invaginando e compreende uma população de células da CN que é especificada mesmo na ausência do mesoderma.

Em todas as espécies de vertebrados, a partir do processo de indução da CN, a expressão de um conjunto de fatores de transcrição vai definir o território da CN. Estes fatores são conhecidos como “especificadores da CN” e compreendem o *AP-2*, *c-Myc*, *FoxD3*, *Id*, *Pax3*, *Slug/Snail*, *Sox9/10*, *Zic1*, entre outros. *Pax3* e *Zic1* atuam sinergicamente, dependente de Wnt, induzindo o aumento da expressão de outros especificadores da CN, tais como *Snail* e *FoxD3*, nas pregas neurais e/ou no tubo neural dorsal. O complexo *c-Myc-Id* media o destino celular através do controle do ciclo celular, mas também mantém um *pool* de progenitores da CN em um estado multipotente. O *Sox9* confere sobrevivência dos precursores da CN truncal (CNT) por induzir o aumento da expressão de *Snail* que é um fator anti-apoptótico. A expressão precoce destes especificadores da CN na população de progenitores da CN segrega estas células do neuroepitélio dorsal e passam a mediar a expressão de genes efetores que levam ao processo de migração e diferenciação final das células da CN (Meulemans & Bronner-Fraser, 2004) (Figura 01).

Após a indução, as células da CN se desprendem do tubo neural e migram como precursores indiferenciados para o seu destino final. Esta delaminação envolve uma transição epitélio-mesenquimal das células da CN caracterizada principalmente pela atividade coordenada de fatores de

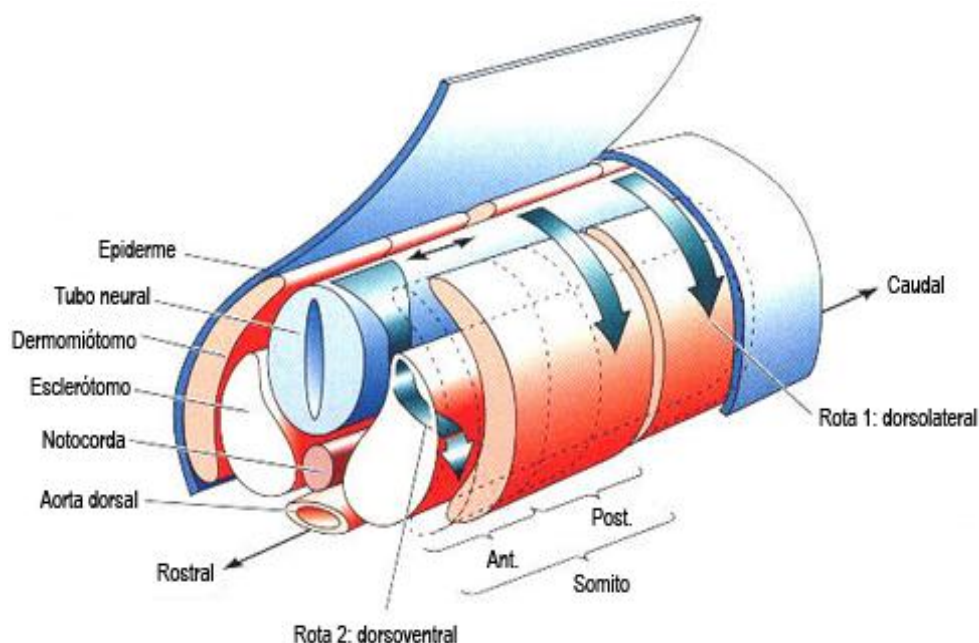
transcrição e moléculas sinalizadoras que estão ativas durante este processo (Figura 01). A ativação destes fatores estimula a expressão de moléculas como RhoA, responsável por rearranjos do citoesqueleto. Além disso, o fator de transcrição *Slug* coordena mudanças nas junções celulares, como a perda da expressão de claudinas e ocludinas, e nas moléculas de adesão, como a perda da expressão de N-caderinas. Estes eventos são essenciais para o início do processo de migração (Thiery & Sleeman, 2006; Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008).



**Figura 01. Etapas da formação da CN.** O esquema mostra a influência dos diversos fatores de transcrição envolvidos nos processos de indução, especificação, transição epitélio-mesenquimal, delaminação e migração da CN. Adaptado de Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008.



As células da CN migram vastamente por todo o embrião através de rotas bem definidas. Existem duas rotas principais pelas quais as células da CN da região truncal (CNT) migram: (1) a rota dorsolateral, que segue por baixo do ectoderma do embrião e originam as células pigmentares; e (2) a rota ventral, onde a migração torna-se descontínua e segmentada, migrando somente através da região anterior do esclerótomo e que originam os neurônios simpáticos e gânglios de raiz dorsal, células adrenomedulares e células de Schwann (Rickmann *et al.*, 1985; Bronner-Fraser, 1986; Teillet *et al.*, 1987) (Figura 02).



**Figura 02: Esquema da migração das células da CN da região truncal.** Na rota 1 as células migram ao longo da rota dorsolateral, abaixo da epiderme, e tornam-se melanócitos. Na rota 2 as células migram dorsoventralmente através da região anterior do somito e dão origem aos neurônios simpáticos e parassimpáticos, aos gânglios de raiz dorsal e às células adrenomedulares. Adaptado de Gilbert, 2000.

Quando o tubo neural e sua crista neural associada são invertidos, as células da CN continuam a migrar. Entretanto, agora elas se movimentam em direção dorsal e não mais ventralmente, indicando dessa forma, que elas mantêm sua orientação original em relação ao tubo neural. Além do mais, quando células da CN ou suas derivadas são colocadas (por transplante ou por injeção) em uma rota migratória de células da CN de um hospedeiro, elas

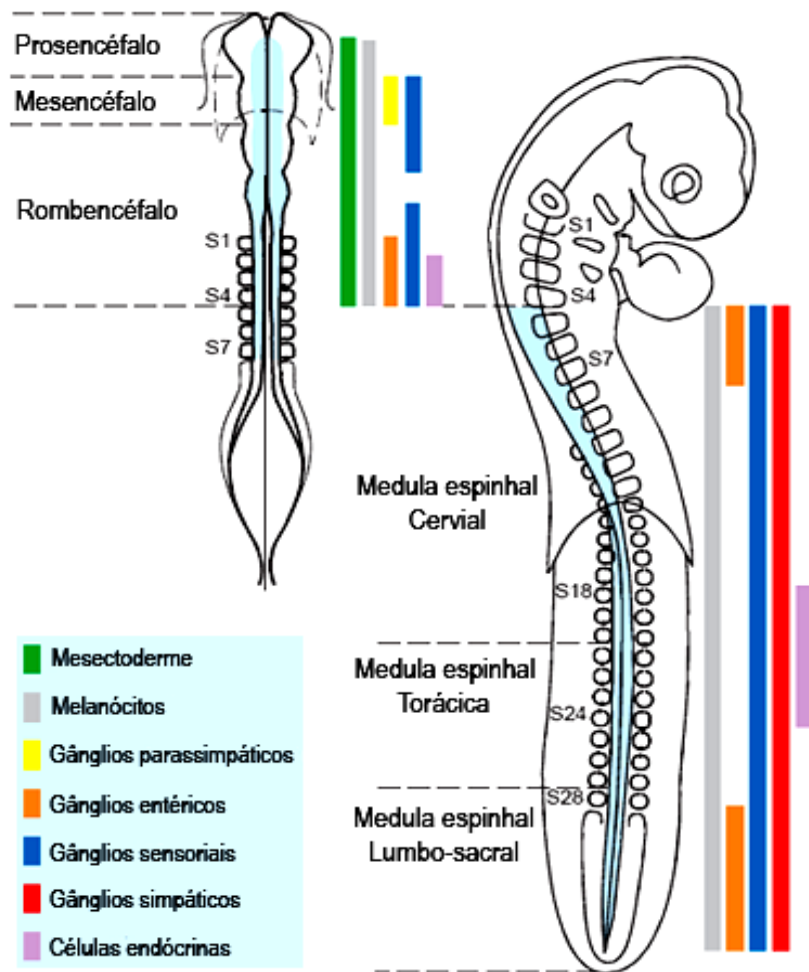
migrarão ao longo dessa via. Outras células embrionárias não se orientam dessa maneira e permanecem onde foram colocadas (Erickson *et al.*, 1980; Bronner-Fraser & Cohen, 1980). Portanto, as células da CN são capazes de reconhecer determinadas vias no embrião e migrar ao longo delas.

Sinais intrínsecos dos somitos, entre outros, são responsáveis por orientar a migração das células da CN, bem como determinar o padrão de segmentação dos gânglios periféricos (Bronner-Fraser & Stern, 1991; Keynes & Stern, 1984; Teillet *et al.*, 1987). Várias classes de moléculas sinalizadoras nos somitos e/ou na matriz extracelular (MEC) têm padrões espaços-temporais que guiam a migração das células da CN; elas incluem moléculas permissivas, como fibronectina, laminina, tenascina, vários tipos de colágenos e de proteoglicanos (Bronner-Fraser, 1993) e também moléculas que impedem a migração das células da CN, como é o caso das efrinas (Krull *et al.*, 1997; Wang & Anderson, 1997).

As células da CN, por sua vez, são capazes de reconhecer os sinais do ambiente. Elas expressam proteínas integrinas que se ligam a diversas proteínas da MEC, bem como receptores de efrinas que reconhecem as efrinas expressas na região posterior do somito e impedem a migração celular nesta porção, estabelecendo a segmentação dos gânglios da raiz dorsal (Krull *et al.*, 1997; Wang & Anderson, 1997).

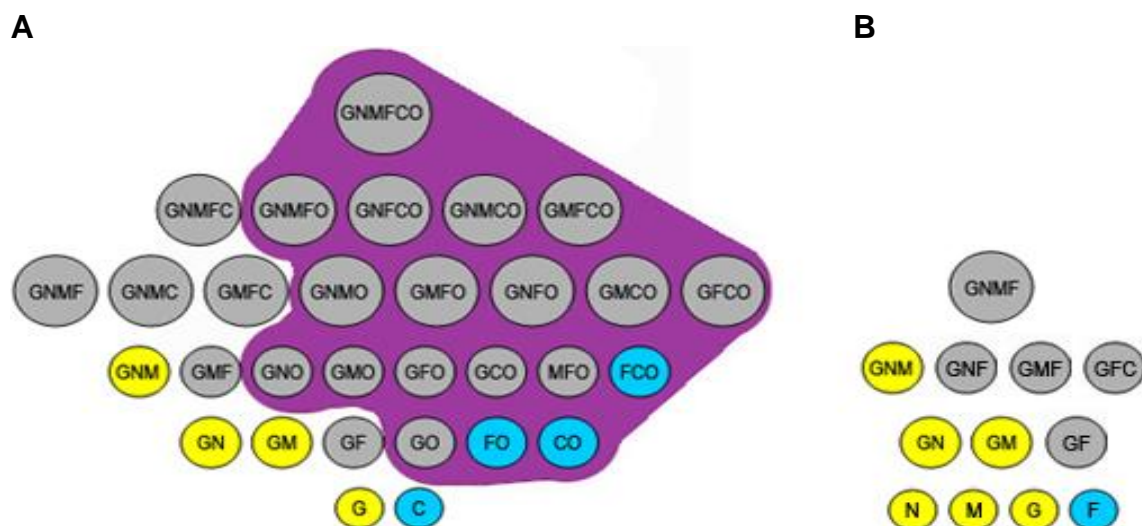
### **1.1.2. Diferenciação e Multipotencialidade das Células da CN**

As células da CN dão origem a uma grande variedade de fenótipos celulares diferenciados incluindo todas as células pigmentares presentes na pele, todos os neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico (SNP), células adrenomedulares, células musculares lisas e tecidos conjuntivos cartilaginoso e ósseo da cabeça (LeDouarin & Kalcheim, 1999) (Figura 03).



**Figura 03. Mapa do destino dos fenótipos derivados da CN ao longo do eixo antero-posterior *in vivo*.** Os vários fenótipos celulares originados pelas células da CN ao longo do eixo anteroposterior da prega neural (azul claro) estão mostrados em embriões de galinha de 7 (esquerda) a 28 (direita) somitos (S). À esquerda estão os tecidos originados da CN cefálica; à direita estão os tecidos originados a partir da CNT nas regiões cervical, torácica e lumbo-sacral da medula espinhal. As regiões que dão origem à mesectoderme (verde) se estendem do prosencéfalo até o rombômero 8 (correspondente a S4). Os melanócitos (cinza) são produzidos ao longo de todo o eixo neural. Os gânglios parassimpáticos (amarelo) derivam da CN mesencefálica. Os gânglios entéricos (laranja) têm origem da CN vagal (S1-S7) e lumbo-sacral (posterior a S28). Da região caudal a S4, a CNT origina os gânglios simpáticos do SNP (vermelho), enquanto que os gânglios sensoriais (azul escuro) são originados pela CN mesencefálica e pela CN rombencefálica posterior até o nível lumbo-sacral. As células endócrinas (roxo) se originam da CN dos níveis S2-S4 e S18-S24. Adaptado de LeDouarin *et al.*, 2004.

A CN é composta de células multipotentes, com potencialidade para várias combinações de três ou mais derivados e células de potencialidade mais restrita, tais como progenitores bipotentes glia-neurônio e progenitores comprometidos com alguma linhagem celular (Figura 04). Recentemente, Calloni e colaboradores (2007) confirmaram a existência de precursores comuns para as linhagem mesenquimal e não-mesenquimal, argumentando contra a idéia de que a mesectoderme é segregada de outras linhagens da CN ainda no neuroepitélio.



7

somente células mesenquimais (F, C e/ou O) estão indicados em azul. A grande maioria dos clones gera tanto células neurais quanto mesenquimais (progenitores em cinza), incluindo uma variedade de células da CN osteogênicas (progenitores sombreados em roxo). Estes experimentos levaram à identificação de um progenitor com potencial condrogênico na CNT (GFC) e da célula mais multipotente da CN (progenitor GNMFCO) que está no topo da hierarquia de todos os progenitores derivados da CN conhecidos até hoje. (A) Adaptado de Dupin *et al.*, 2010. (B) Modificado de Calloni, 2007. Ambos com permissão de Giordano W. Calloni.

Durante o processo de migração ou até mesmo antes do seu início, as células da CN gradativamente segregam-se em populações com potencialidades distintas (Baroffio *et al.*, 1991; Trentin *et al.*, 2004 e Dupin *et al.*, 2007). Durante a migração e ao chegar ao sítio final de migração, os fatores do microambiente juntamente com as características intrínsecas adquiridas pela célula determinarão a sua diferenciação final. Mecanismos que regulam o processo de diferenciação dos progenitores derivados da CN têm sido amplamente estudados (Anderson, 1997; LeDouarin & Kalcheim, 1999; Chen & Lechleider, 2004; Calloni *et al.*, 2007; Garcez *et al.*, 2009). Membros da família do FGF atuam diretamente sobre as células da CN estimulando a proliferação, em experimentos *in vitro*. Em culturas de CN, o FGF2 exógeno é capaz de inibir a diferenciação neuronal, provavelmente como consequência de sua atividade mitótica (Murphy *et al.*, 1994) e promover condrogênese em mamíferos (Ido & Ito, 2006). Experimentos realizados no nosso laboratório com células da CNT mostraram que o FGF2 é capaz de promover a proliferação celular e manter as células da CNT em um estado indiferenciado (Bittencourt, 2007) e, quando administrado somente nas primeiras 24 horas (fase em que as células da CNT estão migrando do tubo neural) o FGF2 promove a gliogênese (Garcez *et al.*, 2009). Em culturas de CN de codornas a citocina entodolina 3 (ET3) atua como fator de sobrevivência e mitogênico sobre progenitores melanocíticos comprometidos e promove proliferação e auto-renovação de progenitores comuns para melanócitos e células gliais (Trentin *et al.*, 2004; Real *et al.*, 2006). O fator de crescimento epidermal (EGF) induz a diferenciação neuronal e melanocítica das células da CNT de codornas, *in vitro* (Garcez *et al.*, 2009). Além destes, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) controla a migração das células da CN estimulando a sua diferenciação em neurônio

sensorial em modelos de codorna (Sieber-Blum, 1991); a proteína morfogenética de osso 2 (BMP2) pode direcionar as células da CN para um destino neural (Shah & Anderson, 1997) e o fator de crescimento glial (GGF) favorece a gliogênese na CN em mamíferos (Shah *et al.*, 1994).

A matriz extracelular (MEC) é outro fator responsável por promover o destino dos progenitores multipotentes da CN juntamente com os fatores de crescimento. Além dos seus efeitos na migração das células da CN, as proteínas de MEC também influenciam sua diferenciação (Loring *et al.*, 1982; Perris *et al.*, 1988; Maxwell & Forbes, 1990). Através de análises de culturas clonais e de massa de células da CN truncal de codorna e cefálica de camundongo, Costa-Silva e colaboradores (2009) mostraram que a fibronectina promove a diferenciação para o fenótipo celular de músculo liso não afetando a diferenciação glial, neuronal e melanocítica. Além disso, proteínas de MEC são capazes de regular a diferenciação neuronal e a regeneração axonal em neurônios do SNC (Tom *et al.*, 2004; Turney & Bridgman, 2005; Easley *et al.*, 2006). A vitronectina, expressa durante o desenvolvimento em embriões de camundongo, principalmente no SNC (Seiffert *et al.*, 1995), mostrou auxiliar a proliferação e a diferenciação de neurônios em cultura (Martinez-Morales *et al.*, 1995). Em neurônios derivados de gânglios da raiz dorsal, que são de origem da CNT, a interação da vitronectina com a proteína príon celular (PrP<sup>C</sup>) foi capaz de mediar o crescimento axonal (Hajj *et al.*, 2007).

## **1.2. A Proteína Príon Celular**

As doenças priônicas atraíram a atenção científica há pouco mais de meio século. Estas doenças são definidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) e incluem o kuru e a doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) em humanos, *scrapie* em ovelhas e a encefalopatia espongiforme bovina, mais conhecida como a “doença da vaca louca”. Elas são caracterizadas pela agregação de proteínas no citoplasma neuronal e conseqüente neurodegeneração. As doenças priônicas ocorrem esporadicamente em mais de 85% dos casos, são hereditárias em cerca de 10% e adquiridas através da infecção em menos de 1% dos casos. Apesar de sua prevalência ser

relativamente baixa, as EETs são incuráveis e fatais (Prusiner *et al.*, 1998; Knight & Will, 2004).

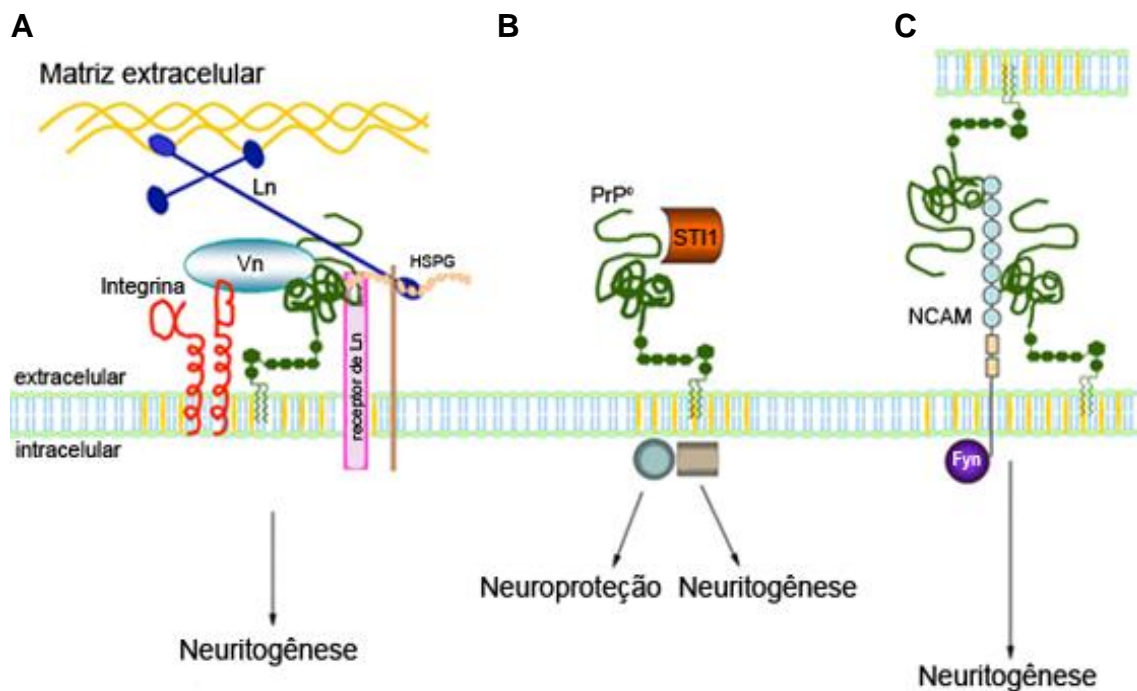
Estudos sobre o kuru entre a população Fore que habita uma região da Papua-Nova Guiné indicou que esta EET era transmitida através de rituais de canibalismo. De fato, a injeção de tecido do cérebro de pacientes infectados em cérebros de chimpanzés saudáveis induziu uma doença similar, enquanto que a incidência do kuru diminuiu drasticamente com o fim dos rituais de canibalismo entre a tribo Fore (Gajdusek, 1977). O agente causador das doenças priônicas foi capaz de resistir a altas doses de radiação (Alper, 1985) e de vários agentes químicos que facilmente inativam vírus e bactérias, sugerindo que a partícula infecciosa era livre de ácido nucléico (Bellinger-Kawahara *et al.*, 1987). Estudos subsequêntes mostraram que a proteína príon infecciosa se origina a partir de mutações no gene que sintetiza a forma normal da proteína príon (Prusiner, 1998). Esta forma normal da proteína príon, conhecida como proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>), é uma glicoproteína de superfície celular ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) abundantemente expressa no sistema nervoso, em vários componentes celulares do sistema imune, na medula óssea, no sangue e em muitos outros órgãos e tecidos (Linden *et al.*, 2008). Ao entrar em contato com a PrP<sup>c</sup> presente nas células, a proteína infecciosa induz uma mudança conformacional da proteína príon normal em sua forma infecciosa (Prusiner, 1998).

Nos últimos anos vários cientistas têm se dedicado ao estudo das funções biológicas de PrP<sup>c</sup> e os resultados sugerem que sua significância vai além das doenças priônicas. A produção de camundongos que tiverem o gene para PrP<sup>c</sup> deletado mostrou que estes animais aparentemente não apresentaram problemas durante o desenvolvimento e nasceram sem grandes anormalidades; devido, provavelmente, à presença de mecanismos compensatórios (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). Porém, estudos mais detalhados mostraram algumas alterações no ritmo circadiano (Tobler *et al.*, 1996), na função dos neurônios hipocampus (Collinge *et al.*, 1994), no aprendizado espacial (Criado *et al.*, 2005), nos níveis de cobre e cuproenzimas no cérebro (Brown *et al.*, 1997), nos mecanismos relacionados a danos

oxidativos (Shyu *et al.*, 2005), na resposta inflamatória e na fagocitose (de Almeida *et al.*, 2005), na renovação de células-tronco hematopoiéticas (Zhang *et al.*, 2006), na diferenciação de células-tronco neurais (Steele *et al.*, 2006) e na resposta ao estresse (Nico *et al.*, 2005).

Para melhor entender as funções biológicas da PrP<sup>c</sup>, moléculas ligantes foram extensivamente investigadas (revisado por Linden *et al.*, 2008). Muitas das funções relacionadas à PrP<sup>c</sup> dependem da sua ligação com outras moléculas. Hajj e colaboradores (2007) mostraram que PrP<sup>c</sup> interage diretamente com a proteína de MEC vitronectina promovendo neuritogênese em neurônios de gânglios da raiz dorsal. Além da vitronectina, outros ligantes de PrP<sup>c</sup> também foram capazes de induzir diferenciação neuronal através de sua interação com PrP<sup>c</sup>, como é o caso da proteína de MEC laminina (Graner *et al.*, 2000a,b), da molécula de adesão celular neural (NCAM) (Santucci *et al.*, 2005) e da fosfoproteína induzida por estresse do tipo 1 (STI1) (Lopes *et al.*, 2005). A proteína STI1 é uma co-chaperonina que foi primeiramente descrita em um complexo macromolecular com as chaperonas Hsp70 e Hsp 90 (Blatch *et al.*, 1997; Lässle *et al.*, 1997). STI1 possui alta afinidade e alta especificidade com PrP<sup>c</sup> tanto *in vitro* quanto *in vivo* e a associação entre essas duas moléculas induz neuroproteção (Chiarini *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2002) e neuritogênese (Lopes *et al.*, 2005) (Figura 05).





**Figura 05. Ligantes de PrP<sup>c</sup> envolvidos com atividade neurotrófica.** (A) PrP<sup>c</sup> interage diretamente com proteínas da MEC, laminina (Ln) e vitronectina (Vn), com receptor de laminina, possivelmente formando um complexo multiprotéico envolvido com neuritogênese. A interação de PrP<sup>c</sup> com receptor de laminina é mediada por proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG). Os receptores de MEC, integrinas, também participam do complexo. (B) PrP<sup>c</sup> interage com STI1 mediando neuroproteção e neuritogênese através de vias de sinalização independentes. (C) NCAM interage com PrP<sup>c</sup> promovendo neuritogênese através da ativação de Fyn kinase. Adaptado de Martins *et al.*, 2009.

Apesar de todos estes achados, até o momento não existe nenhum trabalho na literatura relacionando PrP<sup>c</sup> e STI1 com o processo de diferenciação das células da CN. Porém, algumas estruturas derivadas da CN expressam PrP<sup>c</sup>, como é o caso dos gânglios da raiz dorsal (Tremblay *et al.*, 2007). Em resultados já mencionados, Hajj e colaboradores (2007) mostram a influência de PrP<sup>c</sup> em neurônios de gânglios da raiz dorsal. Além disso, em resultados ainda não publicados do grupo de Vilma R. Martins, PrP<sup>c</sup> foi capaz de modular a diferenciação de células-tronco obtidas a partir de neuroesferas de gânglios da raiz dorsal. Por causa desses achados, surgiu o interesse em estudar a influência de PrP<sup>c</sup> e de STI1 nas células da CN embrionária.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a influência da proteína príon celular (PrP<sup>c</sup>) e da fosfoproteína induzida por estresse do tipo 1 (STI1) sobre a diferenciação das células da crista neural da região truncal (CNT) de codornas, *in vitro*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a expressão de PrP<sup>c</sup> e de STI1 pelas células da CNT de codornas *in vitro*;
- Avaliar a influência de PrP<sup>c</sup> e de STI1 na expressão fenotípica das células da CNT de codornas durante a fase de migração a partir do tubo neural (primeiras 24 horas de cultura), pois é nesta fase que encontramos os progenitores mais indiferenciados e multipotentes da CN;
- Avaliar a influência de PrP<sup>c</sup> e de STI1 na expressão fenotípica das células da CNT de codornas durante a fase de diferenciação celular, após as células da CNT terem migrado do tubo neural, quando os progenitores começam a assumir caminhos de diferenciação celular e, assim, a apresentar uma potencialidade mais restrita;
- Verificar se o domínio da molécula de STI1 de interação com PrP<sup>c</sup> é responsável pelos seus efeitos na diferenciação celular da CN. Para tanto, utilizamos o peptídeo 230-245 de STI1 (pepSTI1<sub>230-245</sub>) que corresponde à região de interação com PrP<sup>c</sup>.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

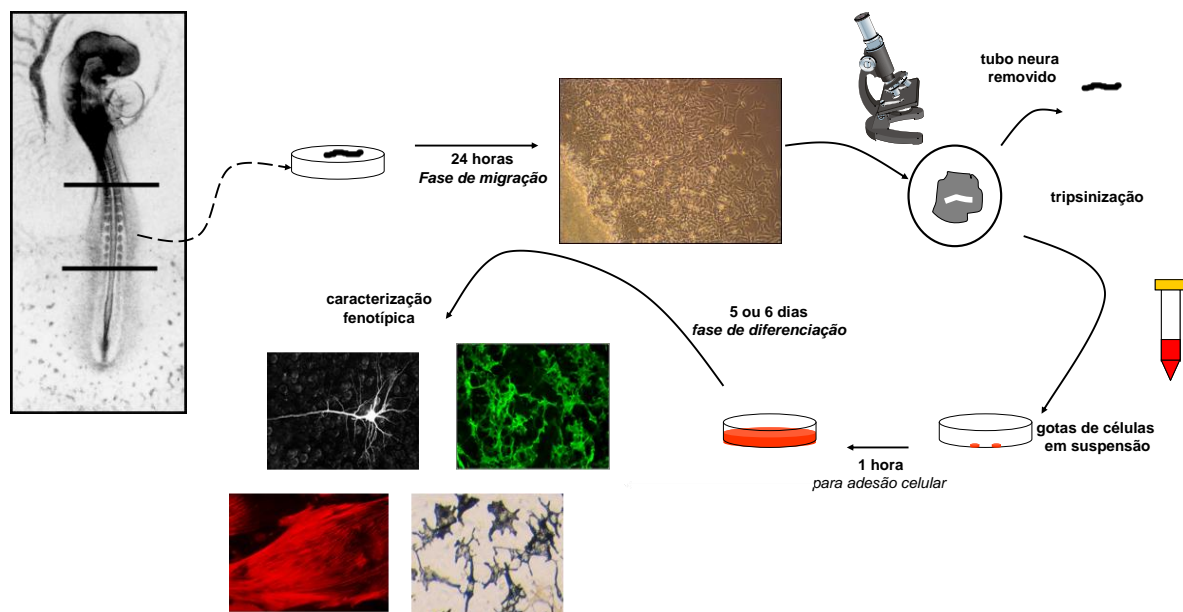
Ovos fertilizados de codorna foram incubados por 48 horas a temperatura de 38°C. Os genitores foram obtidos de criação própria, no biotério setorial do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina, e mantidos em ciclo de 17 horas claro e 7 horas escuro, possuindo água e ração *ad libitum*. A utilização destes animais está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC, em 09 de julho de 2007, sob o protocolo de pesquisa/ensino número PP00103/CEUA/UFSC.

#### **3.2. Culturas de células da CNT de codornas**

Para as culturas primárias de células da CNT de codornas, os embriões (estágio de 20-22 pares de somitos) foram dissecados com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus). Os tubos neurais da região truncal foram retirados e dissecados na presença de pancreatina (6,25 g/L, Sigma) e então colocados em placas de cultura de 35 mm de diâmetro (Corning, NY, USA) em meio *α-modified minimum essential* ( $\alpha$ -MEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultlab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (10  $\mu$ g/mL) (meio básico).

Após 24 horas de cultura os explantes do tubo neural foram removidos e as células remanescentes, que correspondem às células migratórias da CNT, foram removidas com solução de Tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma) e replaqueadas em gotas com 400 células em placas de 35 mm. Após uma hora para adesão celular, as células foram cultivadas por 5 dias em meio complexo composto por  $\alpha$ -MEM, contendo 10% de SFB, 2% de EE, hidrocortisona (0,1  $\mu$ g/mL), transferrina (10  $\mu$ g/mL), insulina (1 ng/mL), 3-3'-5 triiodo-L-thironina

(T<sub>3</sub>) (0,4 ng/mL), glucagon (0,01 ng/mL), EGF (0,1 ng/mL), FGF2 (0,2 ng/mL), penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade por 5 dias e então fixadas com paraformaldeído a 4% (1 hora, temperatura ambiente) e submetidas à análise fenotípica (descrita abaixo) (Dupin *et al.*, 1990; Trentin *et al.*, 2004) (Figura 06).

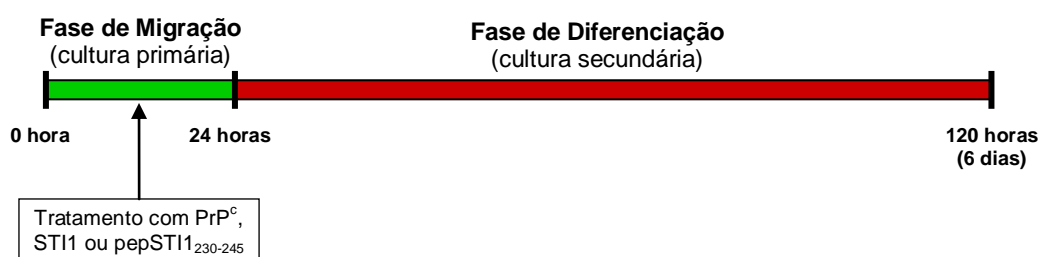


**Figura 06. Procedimento para retirada do tubo neural e obtenção das células da CNT.** O tubo neural da região truncal de embriões de codorna com 20-22 somitos são retirados, dissecados e plaqueados. Após 24 horas, fase em que as células da crista neural migram do tubo neural, este é removido. As células remanescentes são tripsinizadas, centrifugadas e plaqueadas em gotas. Após 1 hora para adesão celular, o meio de cultura é acrescentado. A caracterização fenotípica se dá após 5 ou 6 dias de cultura secundária (fase de diferenciação).

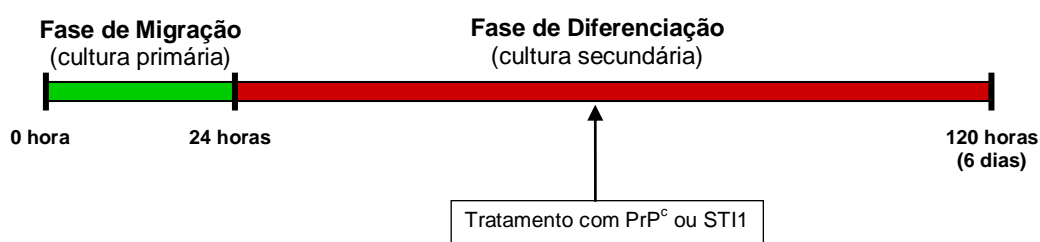
### 3.3. Tratamento das culturas celulares com PrP<sup>c</sup>, STI1 ou pepSTI1<sub>230-245</sub>

Para verificar a influência de PrP<sup>c</sup> ou de STI1 durante a fase de migração (24 horas de cultura primária) PrP<sup>c</sup> ou STI1 nas concentrações de 5, 10 ou 20 ng/mL foram adicionados ao meio de cultura básico (gentilmente doados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Martins, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer). Durante os 5-6 dias de cultura secundária (fase de diferenciação) as células foram cultivadas no meio complexo descrito acima (Figura 07 A).

**A**



**B**



**Figura 07. Esquema dos períodos de tratamento das células da CNT.** As barras representam todo o período de cultura. Em verde está representado o período de 24 horas da cultura primária, em que as células da CNT migram a partir do tubo neural, ou a fase de migração. Em vermelho está representado o período da cultura secundária, ou fase de diferenciação, onde as células da CNT permanecem por 5 dias em cultura na presença do meio complexo. (A) Tratamento com PrP<sup>c</sup>, STI1 ou pepSTI1<sub>230-245</sub> na fase de migração. (B) Tratamento com PrP<sup>c</sup> ou STI1 na fase de diferenciação.

Com o objetivo de verificar se o domínio de interação da molécula de STI1 com PrP<sup>c</sup> é o responsável pelos possíveis efeitos na diferenciação celular da CN, o pepSTI1<sub>230-245</sub> (0,15 nM) (gentilmente doado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Martins, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer), que é um peptídeo correspondente à região 230-245 de STI1 (região de ligação a PrP<sup>c</sup>), foi adicionado ao meio de cultura somente na fase de migração das células da CNT. Na fase de diferenciação (5 ou 6 dias) as células permaneceram em meio complexo (Figura 07 A).

Para verificar a influência de PrP<sup>c</sup> ou de STI1 durante a fase de diferenciação essas moléculas foram adicionadas ao meio de cultura somente nos 5 dias de cultura secundária. Durante a fase de migração as células

permaneceram em meio de cultura contendo 10% de SBF e 2% de extrato de embrião de galinha (Figura 07 B).

### **3.4. Imunocitoquímica e identificação fenotípica**

Os fenótipos da CN foram analisados através de marcadores específicos para cada tipo celular. O fenótipo melanocítico foi analisado através da expressão do pigmento melanina, em microscópio de contraste de fase (Olympus CK 40). Para a análise da expressão endógena de PrP<sup>c</sup> e de STI1 e dos fenótipos celulares da CN, neurônio, glia e músculo liso, foi utilizado o método de imunocitoquímica para fluorescência. Para tal, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 1 hora e, a seguir, lavadas com solução de salina tamponada de fosfato (PBS) (pH 7,6). As células, após fixação, foram permeabilizadas, quando necessário, com solução de PBS-Triton X-100 0,25% por 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir a marcação de antígenos citoplasmáticos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB em PBS durante 1 hora. As células foram então lavadas com PBS e incubadas, por 1 hora a 37°C, com marcadores específicos para PrP<sup>c</sup> e STI1 e para os diferentes fenótipos que a CNT pode originar (Tabela 1).

**Tabela 01. Anticorpos primários utilizados para os diferentes tipos celulares analisados.**

<b>Tipo celular</b>	<b>Anticorpo primário</b>	<b>Produzido em</b>	<b>Imuno-globulina</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fonte</b>
<b>Células PrP<sup>c</sup> positivas</b>	<b>anti-PrP<sup>c</sup></b>	camundongo	IgG	1:100	gentilmente doados pela Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Vilma Martins, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
<b>Células STI1 positivas</b>	<b>anti-STI1</b>	coelho	IgG	1:100	
<b>Células gliais</b>	<b>anti-SMP</b> (proteína mielínica de célula de Schwann)	camundongo	IgG1	1:200	gentilmente doado pela Dr <sup>a</sup> . Nicole LeDouarin, Collège de France, CNRS
<b>Célula muscular lisa</b>	<b>anti-SMA</b> (actina de músculo liso)	camundongo	IgG2a	1:300	Sigma
<b>Neurônio</b>	<b>anti-β-tubIII</b> (tubulina tipo beta-III)	camundongo	IgG1	1:500	Promega

As células foram então lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) e subsequentemente incubadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários (Tabela 02).

**Tabela 02. Relação dos anticorpos secundários utilizados.**

<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Reconhece</b>	<b>Conjugado a</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fonte</b>
<b>anti-IgG</b>	camundongo	Cy3	1:2000	Sigma
<b>anti-IgG</b>	coelho	Texas red	1:100	Sigma
<b>anti-IgG1*</b>	camundongo	Biotina	1:75	PerkinElmer
<b>anti-IgG1</b>	camundongo	Texas red	1:100	Sigma
<b>anti-IgG2a</b>	camundongo	Texas red	1:300	Sigma

\* seguido de incubação com estreptavidina (1:150, 1 h; Perkinelmer) e tiramida (1:200, 30 min; Perkin Elmer).

As células foram novamente lavadas com PBS e então incubadas por 40 segundos com corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI) (1 µg/mL; Sigma) e observadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX71).

### **3.5. Análise estatística**

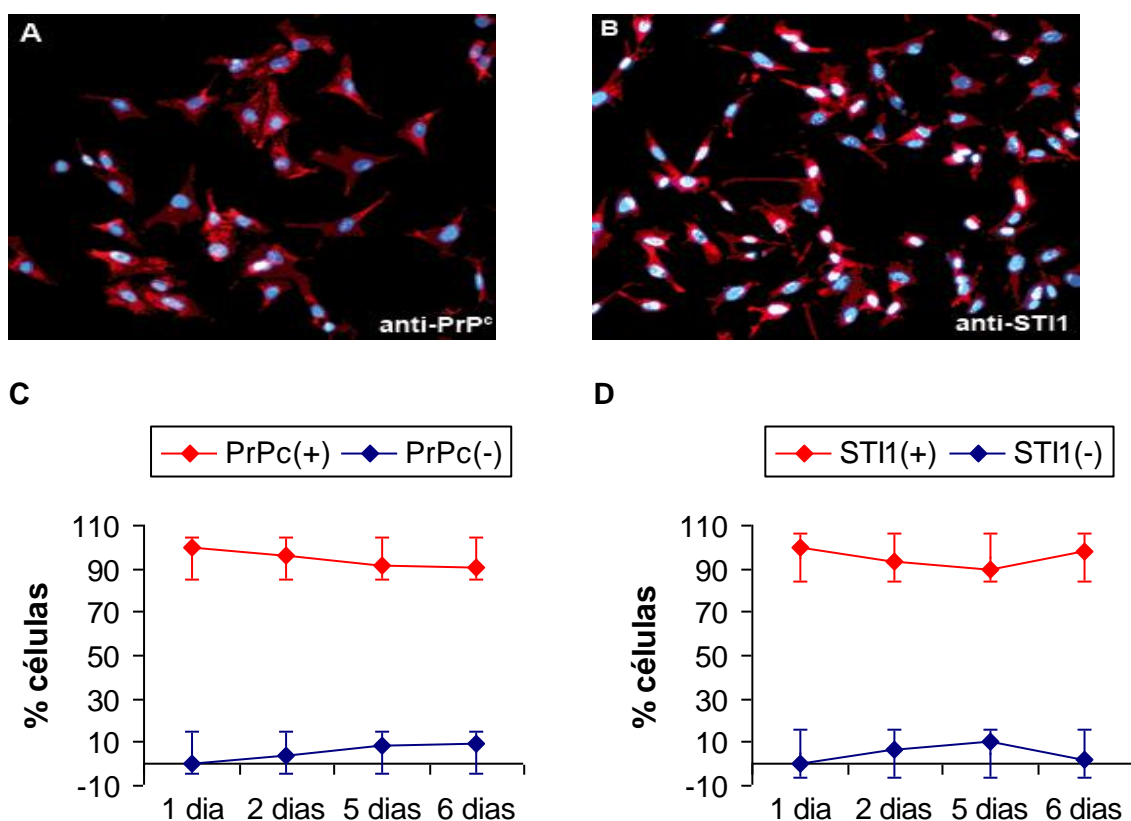
As significâncias das diferenças foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Tukey, através do software estatístico GraphPad Prism4<sup>®</sup>. Os resultados foram considerados significantes quando  $P < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expressão de PrP<sup>c</sup> e de STI1 nas células da CNT

Para verificar a expressão de PrP<sup>c</sup> e de STI1 pelas células da CNT foram realizadas análises de imunocitoquímica em culturas de 1, 2, 5 e 6 dias (Figuras 08 A e B). Através da análise quantitativa verificou-se que nas culturas de 1 dia todas as células (100%) expressavam tanto PrP<sup>c</sup> quanto STI1. Com o tempo de cultura, observamos um progressivo aumento no número total de células. Todavia, a porcentagem de células, em relação ao número total, expressando PrP<sup>c</sup> diminuiu para 96% em 2 dias, 92% ( $\pm 2,21$ ) em 5 dias e 90% ( $\pm 2,21$ ) em 6 dias (Figura 08 C) e a porcentagem de células expressando STI1 diminuiu para 94% ( $\pm 2,31$ ) em 2 dias, 90% ( $\pm 2,31$ ) em 5 dias e aumentou para 98% ( $\pm 2,31$ ) em 6 dias (Figura 08 D).



**Figura 08. Análise da expressão de PrP<sup>c</sup> e de STI1 nas células da CNT.** Imunofluorescência indireta para PrP<sup>c</sup> (A) e para STI1 (B) (vermelho); marcação nuclear realizada com DAPI (azul). (C) Gráfico da expressão de PrP<sup>c</sup> e (D) de STI1 ao longo dos dias de cultura. Para as quantificações apresentadas em C e D foram

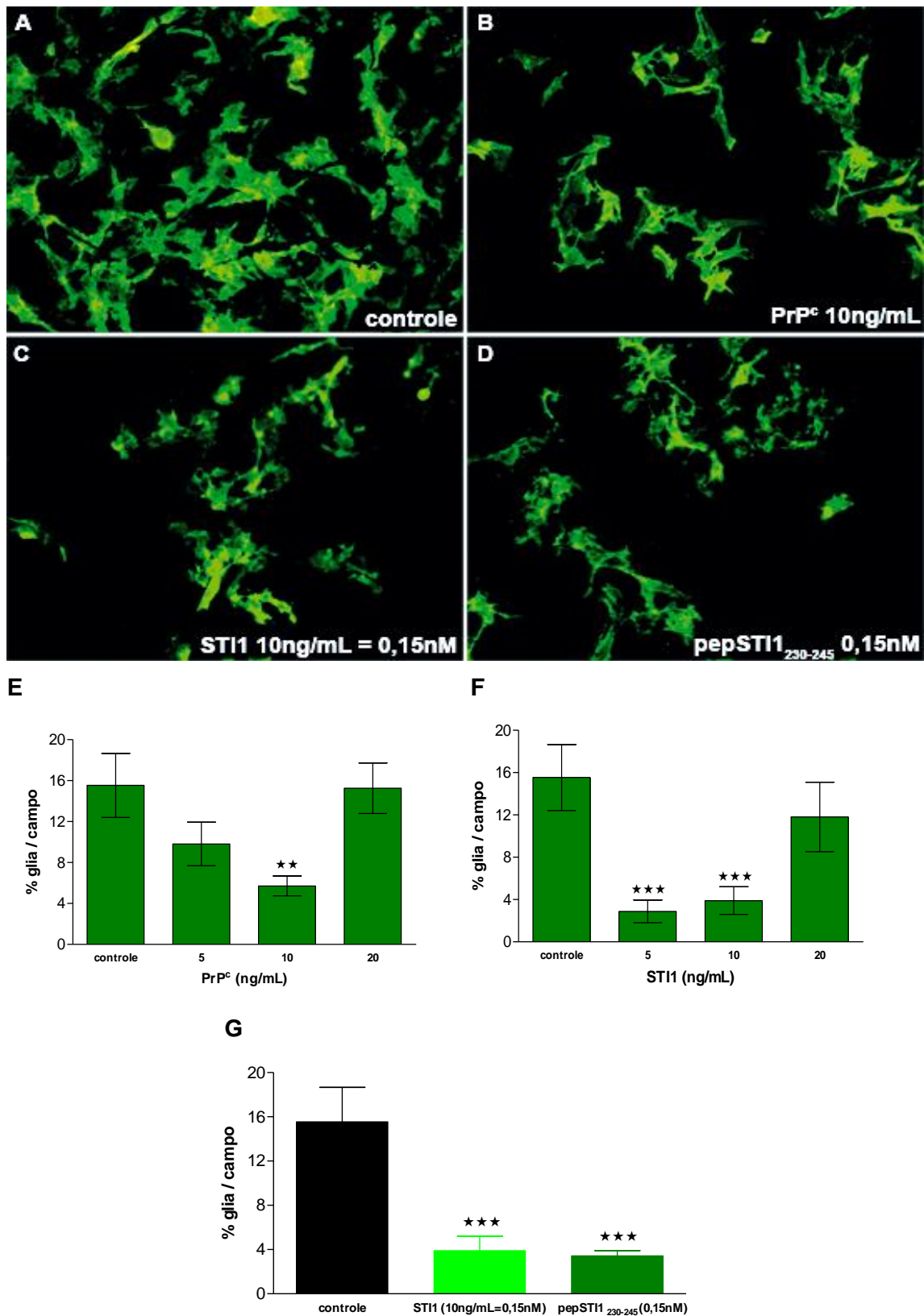
contadas as células de cinco campos aleatórios. Resultado expresso como a porcentagem de células totais em dois experimentos independentes. Aumento: 200x.

#### **4.2. Efeitos dos tratamentos com PrP<sup>c</sup>, STI1 e pepSTI<sub>230-245</sub> na fase de migração das células da CNT**

Com o objetivo de analisar os efeitos de PrP<sup>c</sup>, STI1 e do peptídeo pepSTI<sub>230-245</sub> sobre a diferenciação das células da CNT foram realizadas curvas de concentração de 5, 10 e 20ng/mL tanto para o tratamento com PrP<sup>c</sup> quanto para STI1 afim de verificar se existia diferenças em relação ao controle. O peptídeo de STI1, pepSTI<sub>230-245</sub>, foi utilizado em uma concentração equimolar a STI1 10 ng/mL.

##### **4.2.1. Análise do fenótipo glial**

Analisando o fenótipo glial foi possível observar que o tratamento das células da CNT de codorna tanto com PrP<sup>c</sup> (Figura 09 B e E) quanto com STI1 (Figura 09 C e F) durante a fase de migração (primeiras 24 horas) promoveu uma significativa diminuição na proporção de tal fenótipo em ambos os tratamentos na concentração de 10 ng/mL (cerca de 2,5 vezes menos glia em PrP<sup>c</sup> e de 4 vezes menos em STI1) (Figura 09). Por outro lado, PrP<sup>c</sup> nas concentrações de 5 ng/mL e 20 ng/mL e STI1 na concentração de 20 ng/mL não alteraram a proporção de células gliais quando comparados ao controle (Figura 09 E e F). O tratamento com pepSTI<sub>230-245</sub> teve efeito semelhante ao de STI1 10 ng/mL, diminuindo a porcentagem de células gliais (Figura 09 D e G).

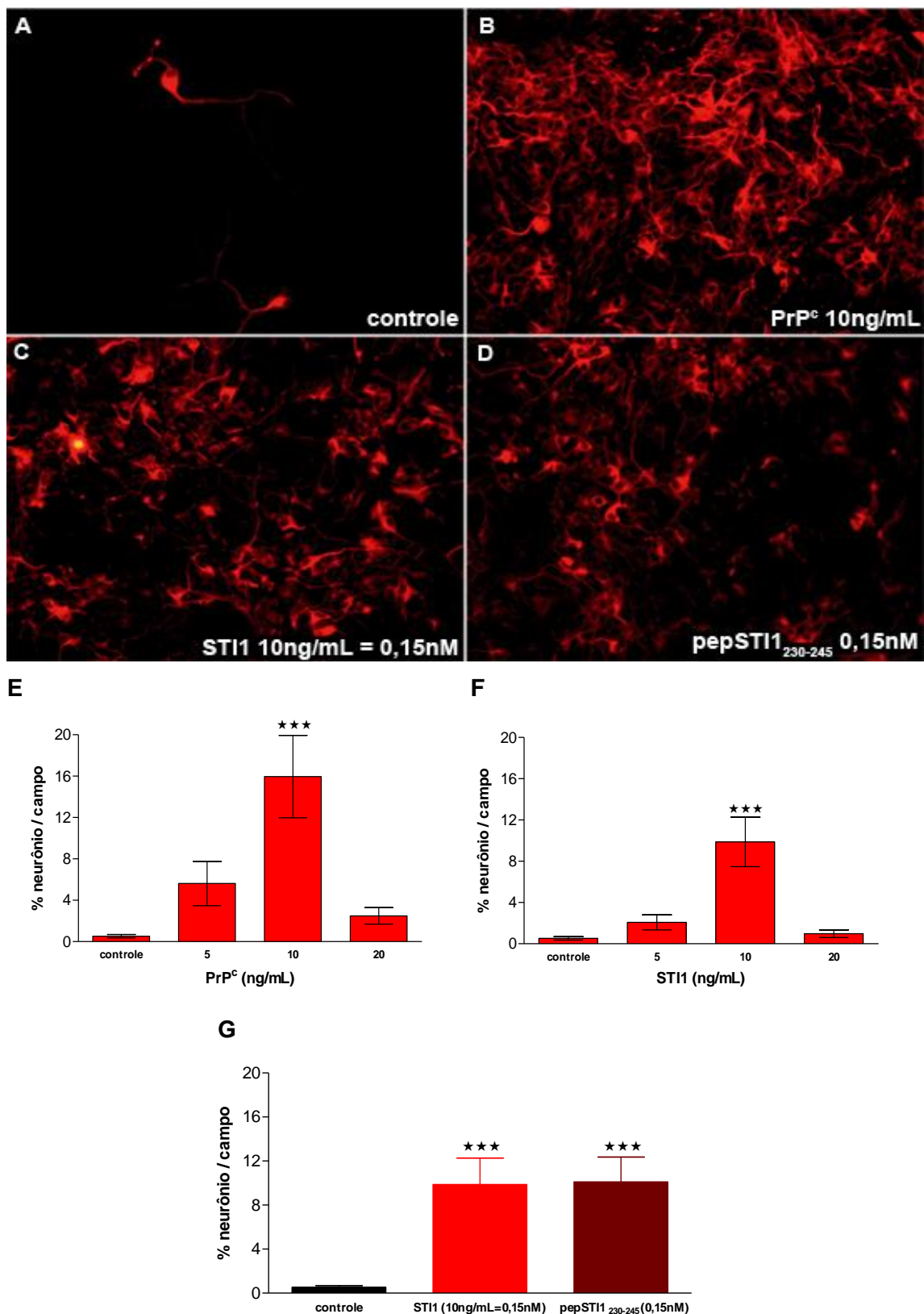


**Figura 09. Análise do fenótipo glial sob a influência de PrP<sup>c</sup>, ST11 e pepST11<sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura. (A-D) Imunofluorescência indireta para a identificação das células gliais a partir de culturas controle (A) e tratadas com PrP<sup>c</sup> a 10 ng/mL (B), ST11 a 10 ng/mL (C) e com o**

peptídeo pepSTI1<sub>230-245</sub> (D). (E-G) Análise quantitativa de células gliais a partir de culturas controle e tratadas com PrP<sup>c</sup> (E), STI1 (F) e pepSTI1<sub>230-245</sub> (G). (E e F) Resultados expressos como proporção de células gliais, contando-se 20 campos aleatórios em 5 experimentos independentes. (G) Os resultados estão expressos como proporção de células gliais, contando-se pelo menos 10 campos aleatórios em pelo menos 2 experimentos independentes. \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 vs. controle, por ANOVA de uma via com pós-teste de múltipla comparação de Tukey. (Aumento: 200x).

#### **4.2.2. Análise do fenótipo neuronal**

Ao mesmo tempo em que a proporção de células gliais diminuiu com o tratamento de PrP<sup>c</sup>, ou de STI1, a proporção de células neuronais aumentou significativamente. Analisando o fenótipo neuronal, foi verificado um aumento significativo em relação ao controle na proporção de neurônios após o tratamento, durante a fase de migração, com 10 ng/mL de PrP<sup>c</sup> (cerca de 10 vezes) (Figura 10 A, B e E) e com 10ng/mL de STI1 (cerca de 5 vezes) (Figura 10 A, C e F). A proporção de células neuronais manteve-se aos níveis do controle com os tratamentos de 5 ng/mL e 20 ng/mL de PrP<sup>c</sup> ou de STI1 (Figura 10 E e F). O tratamento com o pepSTI1<sub>230-245</sub> foi semelhante ao de STI1 10 ng/mL, aumentando a porcentagem de neurônios na cultura em cerca de 5 vezes (Figura 10 D e G).

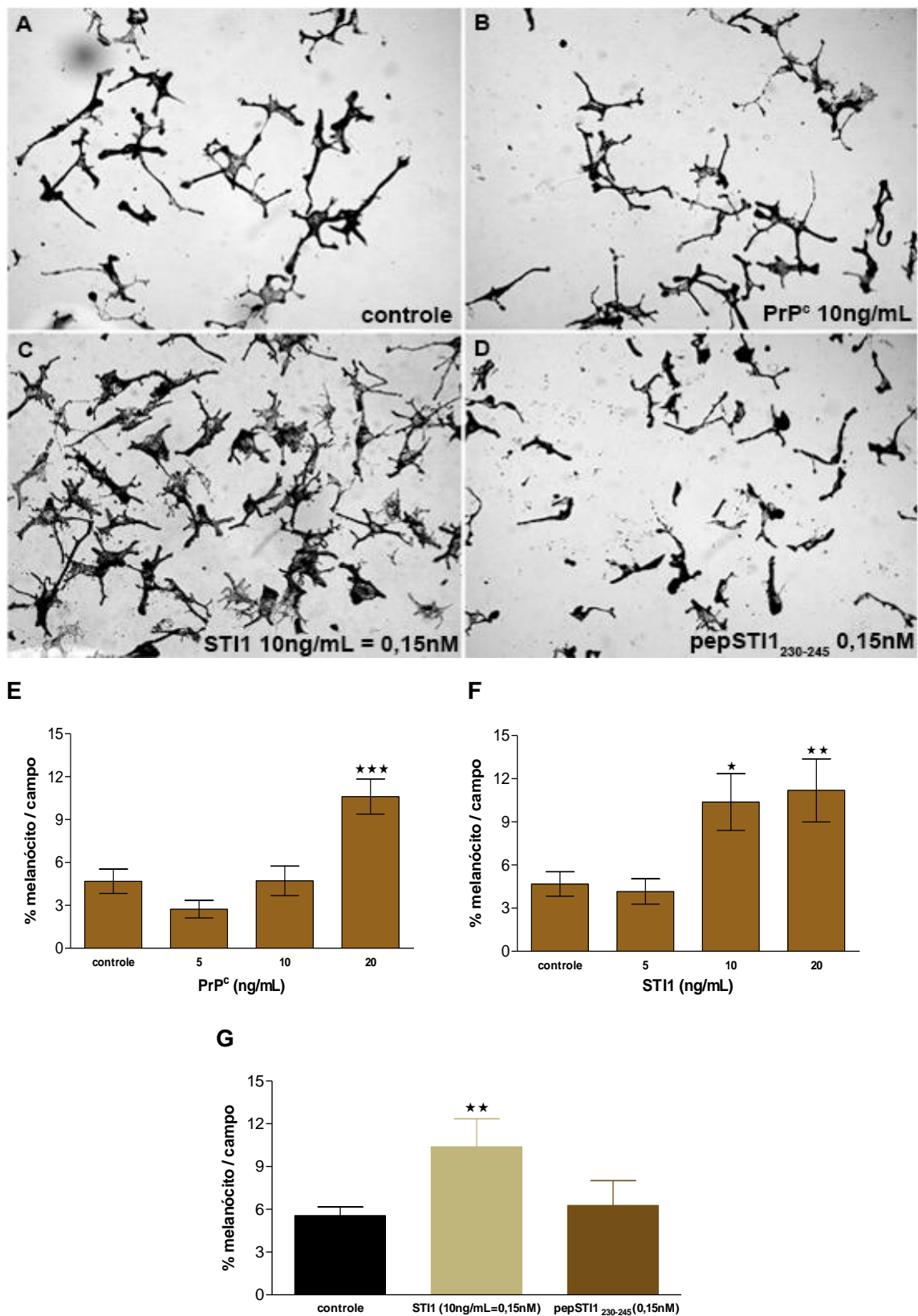


**Figura 10. Análise do fenótipo neuronal sob a influência de PrP<sup>c</sup>, STI1 e pepSTI1<sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura. (A-D) Imunofluorescência indireta para a identificação das células neuronais a partir de culturas controle (A) e tratadas com PrP<sup>c</sup> a 10 ng/mL (B), STI1 a 10 ng/mL (C) e com o**

peptídeo pepSTI1<sub>230-245</sub> (D). (E-G) Análise quantitativa de células neuronais a partir de culturas controle e tratadas com PrP<sup>c</sup> (E), STI1 (F) e pepSTI1<sub>230-245</sub> (G). (E e F) Resultados expressos como proporção de células neuronais, contando-se 20 campos aleatórios em 5 experimentos independentes. (G) Os resultados estão expressos como proporção de células neuronais, contando-se pelo menos 10 campos aleatórios em pelo menos 2 experimentos independentes. \*\*\*P<0,001 vs. controle, por ANOVA de uma via com pós-teste de múltipla comparação de Tukey. (Aumento: 200x).

#### **4.2.3. Análise do fenótipo melanocítico**

Além dos fenótipos glial e neuronal, foi analisado também a proporção de melanócitos presentes nestas culturas. Foi possível constatar um aumento significativo na proporção do fenótipo melanocítico após o tratamento com PrP<sup>c</sup> a 20 ng/mL (Figura 11 E). O mesmo se repetiu quando realizado o tratamento com STI1, onde as concentrações de 10 ng/mL e 20 ng/mL apresentaram um aumento de duas vezes em relação ao controle (Figura 11 A, C e F). Por outro lado, a proporção de melanócitos se manteve a níveis semelhantes aos do controle com os outros tratamentos (PrP<sup>c</sup> a 5 ng/mL e 10 ng/mL, STI1 a 5 ng/mL e pepSTI1<sub>230-245</sub> a 0,15nM) (Figura 11B, D, E, F e G).



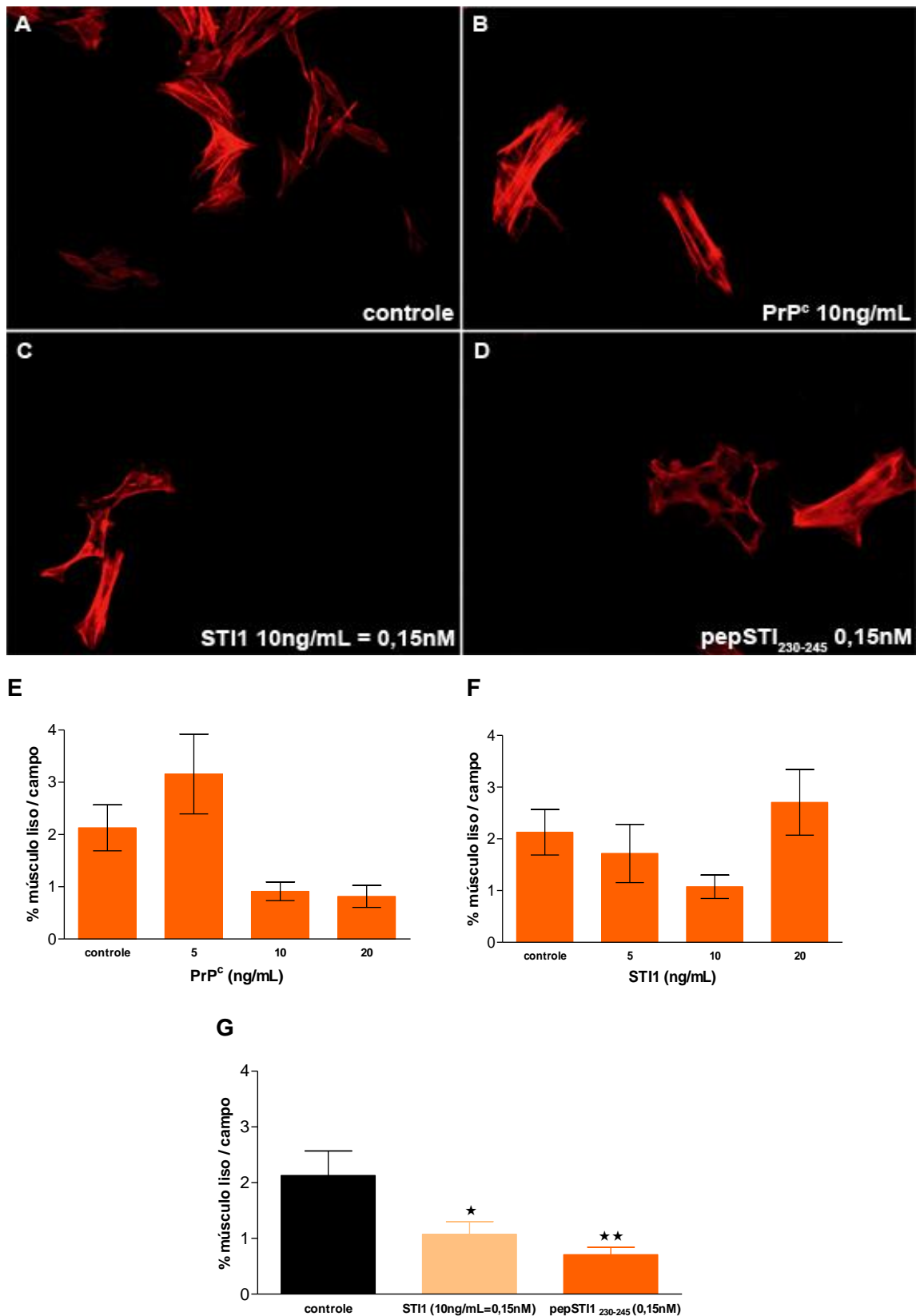
**Figura 11. Análise do fenótipo melanocítico sob a influência de PrP<sup>c</sup>, STI1 e pepSTI1<sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura. (A-D) Análise da expressão do pigmento melanina, em microscópio de contraste de fase, a partir de culturas controle (A) e tratadas com PrP<sup>c</sup> a 10 ng/mL (B), STI1 a 10 ng/mL**

(C) e com o peptídeo pepSTI1<sub>230-245</sub> (D). (E-G) Análise quantitativa de melanócitos a partir de culturas controle e tratadas com PrP<sup>c</sup> (E), STI1 (F) e pepSTI1<sub>230-245</sub> (G). (E e F) Resultados expressos como proporção de melanócitos, contando-se 20 campos aleatórios em 5 experimentos independentes. (G) Os resultados estão expressos como proporção de melanócitos, contando-se pelo menos 10 campos aleatórios em pelo menos 2 experimentos independentes. \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 vs. controle, por ANOVA de uma via com pós-teste de múltipla comparação de Tukey. (Aumento: 200x).

#### **4.2.4. Análise do fenótipo muscular liso**

A análise das células musculares lisas mostrou uma baixa proporção deste tipo celular em todas as condições analisadas. Após o tratamento com as várias concentrações de PrP<sup>c</sup> ou de STI1 não foi observada diferença em relação ao controle (Figuras 12 E e F). Foi verificada apenas uma pequena redução na porcentagem de células musculares lisas nas concentrações de 10 e 20 ng/mL de PrP<sup>c</sup> (Figura 12 B e E) e de 10 ng/mL STI1 (Figura 12 C e F), bem como após tratamento com o pepSTI1<sub>230-245</sub> (Figura 12 D e G).





**Figura 12. Análise das células musculares lisas sob a influência de PrP<sup>c</sup>, STI1 e pepSTI1<sub>230-245</sub> nas células da CNT na fase de migração após 6 dias de cultura. (A-D) Imunofluorescência indireta para a identificação das células musculares lisas a**

partir de culturas controle (A) e tratadas com PrP<sup>c</sup> a 10 ng/mL (B), STI1 a 10 ng/mL (C) e com o peptídeo pepSTI1<sub>230-245</sub> (D). (E-G) Análise quantitativa de células musculares lisas a partir de culturas controle e tratadas com PrP<sup>c</sup> (E), STI1 (F) e pepSTI1<sub>230-245</sub> (G). (E e F) Resultados expressos como proporção de células musculares lisas, contando-se 20 campos aleatórios em 5 experimentos independentes. (G) Os resultados estão expressos como proporção de células musculares lisas, contando-se pelo menos 10 campos aleatórios em pelo menos 2 experimentos independentes. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs. controle, por ANOVA de uma via com pós-teste de múltipla comparação de Tukey. (Aumento: 200x).

#### **4.3. Efeitos dos tratamentos com PrP<sup>c</sup> e de STI1 na fase de diferenciação das células da CNT**

Visto que os tratamentos das células da CNT com PrP<sup>c</sup> e STI1 na fase de migração apresentaram efeitos bastante interessantes, decidiu-se verificar se estes mesmos tratamentos na fase de diferenciação das células da CNT apresentariam os mesmos efeitos. Constatou-se que os tratamentos com PrP<sup>c</sup> ou STI1 durante a fase de diferenciação celular não alteraram de forma significativa a proporção de nenhum dos fenótipos analisados (glia, neurônio, melanócito e célula muscular lisa) (dados não mostrados). Desta forma, os efeitos de PrP<sup>c</sup> e de STI1 se dão na fase mais inicial da migração das células da CNT, ou seja, sobre os progenitores mais indiferenciados.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos recentes sobre as funções do PrP<sup>c</sup> sugerem que sua importância vai além das doenças transmissíveis conhecidas como encefalopatias espongiformes. A expressão de PrP<sup>c</sup> é pronunciada em neurônios, mas também ocorre em vários outros tipos celulares. Além disso, diversas atividades e ligantes para PrP<sup>c</sup> têm sido descritas (Linden *et al.*, 2008). Este trabalho é o primeiro na literatura a demonstrar a expressão de PrP<sup>c</sup> e STI1 em células da CN. Tremblay e colaboradores (2007) mostraram a presença de PrP<sup>c</sup> nas pregas cefálicas, no mesencéfalo e telencéfalo de embriões de camundongos e numa região embrionária que eles chamaram de “mesênquima adjacente à neuroectoderme”. Curiosamente, todas estas regiões correspondem a locais de migração das células da CN cefálica e truncal. Porém, somente neste trabalho é que foi realmente confirmada a expressão de PrP<sup>c</sup> pelas células da CN.

São particularmente notáveis as evidências de que PrP<sup>c</sup> possui um papel importante para o desenvolvimento neuronal, pois muitos dos seus ligantes têm a capacidade de exercer efeitos neurotróficos, sugerindo que PrP<sup>c</sup> possa apresentar um papel de receptor ou co-receptor para fatores neurotróficos (Martins *et al.*, 2009). Nossos resultados apontam para um importante efeito de PrP<sup>c</sup> e também de STI1 na diferenciação, sobrevivência, especificação ou proliferação de determinados progenitores dessa população celular. Os resultados obtidos com o tratamento das células da CNT de codorna com PrP<sup>c</sup> e com STI1 na fase de migração corroboram a importância destas moléculas nas células neuronais, agora também em modelo de crista neural.

O tratamento das células da CNT com PrP<sup>c</sup> na fase de migração fez com que o fenótipo neuronal tivesse suas proporções aumentadas em cerca de dez vezes, efeito inédito na literatura. É possível que as moléculas de PrP<sup>c</sup> fornecidas em cultura às células da CNT estejam sendo internalizadas e então ativando alguma via de sinalização intracelular fazendo com que esta célula passe a expressar um fenótipo neuronal (Linden *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009). Outra possibilidade é que o PrP<sup>c</sup> esteja interagindo com o receptor de baixa afinidade para neurotrofinas, o p75<sup>NTR</sup> (presentes em células da CN)

(Large *et al.*, 1989; LeDouarin & Kalcheim, 1999), já que o PrP<sup>c</sup> possui um sítio de ligação específico para esta molécula (Della-Bianca *et al.*, 2001). As neurotrofinas são fatores com ampla expressão tanto no SNC quanto no SNP. Cada uma das diferentes neurotrofinas possui funções distintas e são essenciais para o desenvolvimento neuronal (Huang & Reichardt, 2001). As funções tróficas das neurotrofinas são mediadas pela interação com receptores específicos, como é o caso do p75<sup>NTR</sup>. Este receptor cria sítios de alta afinidade para as neurotrofinas modulando a resposta para esta família de fatores de crescimento (LeDouarin & Kalcheim, 1999). Portanto, a interação PrP<sup>c</sup>-p75 pode estar ativando uma segunda via de sinalização induzindo também a uma diferenciação neuronal.

Além do tratamento com PrP<sup>c</sup>, o tratamento com STI1 também mostrou uma influência positiva muito importante na diferenciação neuronal. As células da CNT tratadas com STI1 nas primeiras 24 horas apresentaram aumento significativo na proporção de neurônios (cerca de cinco vezes mais). É possível que o STI1 fornecido às células esteja interagindo com o PrP<sup>c</sup> endógeno promovendo essa diferenciação neuronal. Os resultados obtidos com o tratamento das células da CNT na fase de migração com o pepSTI1<sub>230-245</sub> (região de STI1 que interage com PrP<sup>c</sup>) corroboram esta hipótese, pois os efeitos promovidos pelo pepSTI1<sub>230-245</sub> foram similares àqueles promovidos por STI1 para todos os fenótipos analisados (exceto o de melanócito). Desta forma, é possível propor um mecanismo pelo qual STI1 influencia a diferenciação das células da CNT, que seria através da sua interação com PrP<sup>c</sup>. Sabe-se que a interação entre STI1 e PrP<sup>c</sup> promove neuritogênese e neuroproteção em neurônios hipocámpais e da retina, respectivamente, por diferentes caminhos de sinalização (Lopes *et al.*, 2005). Desse modo, estas duas moléculas favorecem o fenótipo neuronal também em modelo de CN.

Nas condições utilizadas em nosso laboratório, normalmente a proporção de neurônios nas culturas de CN é baixa. Nossos resultados demonstraram que tanto o tratamento com PrP<sup>c</sup> quanto o tratamento com STI1 tiveram um efeito bastante expressivo sobre o aumento de células neuronais.

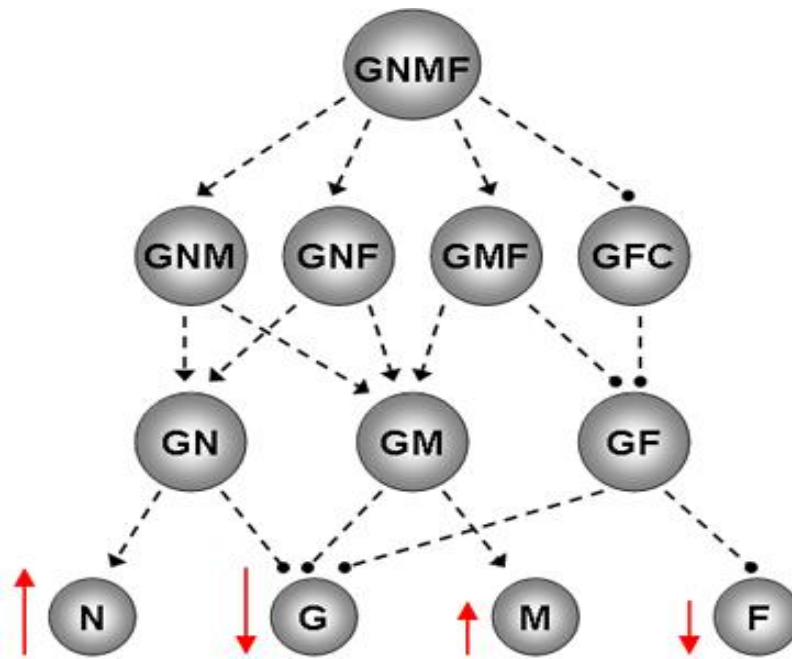
Desse modo, podemos sugerir que ambos os fatores devem ter uma importância fundamental para o desenvolvimento neuronal no SNP.

Por outro lado, verificamos que o mesmo tratamento promove uma diminuição bastante expressiva na proporção de células gliais, ao mesmo tempo em que aumenta a proporção de neurônios. Esta parece ser uma evidência muito importante de que tanto PrP<sup>c</sup> quanto STI1 podem estar direcionando o progenitor glia-neurônio (GN) a uma especificação neuronal em detrimento à glial.

Nossos resultados sugerem ainda que PrP<sup>c</sup> e STI1 possuem um importante papel não só na determinação do fenótipo neuronal, mas também na determinação do fenótipo melanocítico. Utilizando modelo de aves, Trentin e colaboradores (2004) demonstraram que há vários tipos de progenitores da CN: progenitores bipotentes, tripotentes e multipotentes. A alta proporção dos fenótipos neuronal e melanocítico observada após tratamento com estas duas moléculas nas primeiras 24 horas de cultura sugere que estes fatores podem estar agindo sobre os progenitores mais indiferenciados da CNT, como o progenitor glia-neurônio-melanócito (GNM), induzindo uma especificação neuronal e/ou melanocítica.

Considerando que a CN é formada por uma população de progenitores mistos, o fato de ter sido observada uma redução nas células musculares lisas pode ser devido ao direcionamento de um progenitor misto para outro fenótipo, ou simplesmente essas moléculas poderiam estar impedindo a diferenciação final das células musculares lisas.

A Figura 13 apresenta os efeitos de PrP<sup>c</sup> e STI1 sobre as células mais restritas da CNT e os possíveis efeitos destes fatores sobre os progenitores mais indiferenciados, favorecendo os fenótipos neuronal e melanocítico e impedindo a diferenciação destas células em músculo liso e glia.



### 13. Modelo de linhagens celulares da CNT sobre a influência de PrP<sup>c</sup> e de STI1.

As células multipotentes da CN passam por restrições progressivas produzindo precursores intermediários oligopotentes e progenitores já comprometidos com uma linhagem celular, que se diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M) e células musculares lisas (F). Aqui estão demonstrados os efeitos de PrP<sup>c</sup> e de STI1 (setas vermelhas) sobre a diferenciação das células mais restritas da CNT e sugere-se uma possível ação destes fatores (tracejado) sobre os progenitores mais indiferenciados. Em preto: Seta - efeito estimulatório e Bola - efeito inibitório. Modificado de Calloni, 2007, com permissão de Giordano W. Calloni.

O tratamento das células da CNT com PrP<sup>c</sup> e com STI1 somente na fase de diferenciação, ou seja, quando estas células encontram-se um pouco mais diferenciadas e a população multipotente já perdeu certa potencialidade, mostrou não alterar de forma significativa nenhuma das proporções fenotípicas analisadas. Estes resultados negativos são extremamente interessantes, pois reforçam a idéia de que a influência de PrP<sup>c</sup> e de STI1 está sobre os progenitores mais indiferenciados da CNT e que seus efeitos são definidos por uma janela de tempo bastante restrita. Fenômeno semelhante foi observado por Calloni e colaboradores (2007). Em culturas de células da CNC, estes autores observaram que o tratamento com Sonic Hedgehog (Shh) foi capaz de aumentar a proporção de condrócitos em cultura. Esse efeito foi observado exclusivamente quando o tratamento era realizado nas primeiras 48 horas de

cultura. As células da CN também são responsivas ao tratamento com EGF somente quando este é realizado nas fases iniciais da cultura (Garcez *et al.*, 2009). A população mista de progenitores da CN, que migra a partir do tubo neural é extremamente plástica e responsiva aos diversos fatores que encontram no microambiente embrionário. Essa grande potencialidade das células da CN é perdida de maneira relativamente rápida com o comprometimento progressivo dessas células com os fenótipos derivados da CN (LeDouarin & Kalcheim, 1999).

Experimentos futuros serão realizados com o objetivo de elucidar os caminhos pelos quais PrP<sup>c</sup> exerce suas influências sobre a especificação das células da CNT de codorna e culturas clonais serão feitas para determinar o papel de PrP<sup>c</sup> e de STI1 sobre os progenitores multipotentes desta população celular.

## 6. CONCLUSÕES

- A grande maioria das células da CNT expressam tanto PrP<sup>c</sup> quanto STI1 *in vitro* durante todo o período de cultura analisado.
- PrP<sup>c</sup> e STI1 influenciam a diferenciação das células da CNT *in vitro* quando administradas durante a fase de migração, promovendo principalmente a diferenciação neuronal em detrimento da diferenciação glial.
- A influência de PrP<sup>c</sup> e de STI1 parece estar ocorrendo sobre os progenitores mais indiferenciados da CNT, pois estas duas moléculas não apresentam influência significativa quando administradas na fase de diferenciação celular, após as células da CNT terem migrado do tubo neural.
- O efeito de STI1 sobre a diferenciação das células da CNT parece ocorrer pela interação com PrP<sup>c</sup>, visto que o pepSTI1<sub>230-245</sub> (região de STI1 que interage com PrP<sup>c</sup>) mostrou influenciar a diferenciação das células da CNT de maneira semelhante à proteína STI1.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPER, T. (1985). Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation. *Nature* **317(6039)**: 750.
- ANDERSON, D. J. (1997). Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet.* **13(7)**: 276-80.
- BAROFFIO, A.; DUPIN, E. & LEDOUARIN, N. M. (1991). Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development* **112(1)**: 301-5.
- BASCH, M. L.; BRONNER-FRASER, M. & GARCÍA-CASTRO, M. I. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* **441(7090)**: 218-22.
- BELLINGER-KAWAHARA, C.; DIENER, T. O.; MCKINLEY, M. P.; GROTH, D. F.; SMITH, D. R.; PRUSINER, S. B. (1987). Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology* **160(1)**: 271-4.
- BITTENCOURT, D. A. (2007). Efeito do FGF2 na diferenciação de células da crista neural truncal (CNT) de codornas *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis **64 f.**
- BLATCH, G. L.; LÄSSLE, M.; ZETTER, B. R.; KUNDRA, V. (1997). Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene* **194(2)**: 277-82.
- BRONNER-FRASER, M. (1986). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol.* **115**: 44-55.
- BRONNER-FRASER, M. (1993). Mechanisms of neural crest cell migration. *Bioessays.* **15(4)**: 221-30.
- BRONNER-FRASER, M. & COHEN, A. M. (1980). Analysis of the neural crest ventral pathway using injected tracer cells. *Dev. Biol.* **77(1)**: 130-141

- BRONNER-FRASER, M. & STERN, C. (1991). Effects of mesodermal tissues on avian neural crest cell migration. *Dev. Biol.* **143**: 213-17.
- BROWN, D. R.; QIN, K.; HERMS, J. W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P. E.; KRUCK, T.; VON BOHLEN, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D.; KRETZSCHMAR, H. (1997). The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* **390(6661)**: 684-7.
- BUELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H. P.; DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S. B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356(6370)**: 577-82.
- CALLONI, G. W. (2007). Estudos *in vitro* da influência do microambiente nas potencialidades mesenquimais dos progenitores da crista neural. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro **193f**.
- CALLONI, G. W.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LEDOUARIN, N. M.; DUPIN, E. (2007). Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104(50)**: 19879-84.
- CHEN, S. & LECHLEIDER, R. J. (2004). Transforming growth factor-beta-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line. *Circ Res.* **94(9)**: 1195-202.
- CHIARINI, L. B.; FREITAS, A. R.; ZANATA, S. M.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R.; LINDEN, R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21(13)**: 3317-26.
- COLLINGE, J.; WHITTINGTON, M. A.; SIDLE, K. C.; SMITH, C. J.; PALMER, M. S.; CLARKE, A. R.; JEFFERYS, J. G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370(6487)**: 295-7.
- COSTA-SILVA, B.; DA COSTA, M. C.; MELO, F. R.; NEVES, C. M.; ALVAREZ-SILVA, M. CALLONI, G. W.; TRENTIN, A. G. (2009). Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. *Exp. Cell Res.* **315(6)**: 955-67.

- CRIADO, J. R.; SÁNCHEZ-ALAVEZ, M.; CONTI, B.; GIACCHINO, J. L.; WILLS, D. N.; HENRIKSEN, S. J.; RACE, R.; MANSON, J. C.; CHESEBRO, B.; OLDSTONE, M. B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.* **19(1-2)**: 255-65.
- DE ALMEIDA, C. J.; CHIARINI, L. B.; DA SILVA, J. P.; E SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; LINDEN, R. (2005). The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J. Leukoc Biol.* **77(2)**: 238-46.
- DELLA-BIANCA, V.; ROSSI, F.; ARMATO, U.; DAL-PRA, I.; COSTANTINI, C.; PERINI, G.; POLITI, V.; DELLA VALLE, G. (2001). Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J Biol Chem.* **276(42)**: 38929-33.
- DUPIN, E.; BAROFFIO, A.; DULAC, C.; CAMERON-CURRY, P.; LEDOUARIN, N. M. (1990). Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-Schwann cell myelin protein monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(3)**: 1119-23.
- DUPIN, E.; CALLONI, G. W. & LEDOUARIN, N. M. (2010). Cell Diversification During Neural Crest Ontogeny: The Neural Crest Stem Cells, in: Perspectives of Stem Cells. *H. Ulrich* **1ed. In press**. DOI 10.1007/978-90-481-3375-8\_4.
- DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; REAL, C.; TRENTIN, A. G.; LEDOUARIN, N. M. (2007). Neural crest progenitors and stem cells. *C. R. Biol.* **330(6-7)**: 521-29.
- EASLEY, C. A.; FAISON, M. O.; KIRSCH, T. L.; LEE, J. A.; SEWARD, M. E.; TOMBES, R. M. (2006). Laminin activates CaMK-II to stabilize nascent embryonic axons. *Brain Res.* **1092(1)**: 59-68.
- ENDO, Y.; OSUMI, N. & WAKAMATSU, Y. (2002). Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development* **129(4)**: 863-73.
- ERICKSON, C. A.; TOSNEY, K. W. & WESTON, J. A. (1980). Analysis of migratory behavior of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. *Dev. Biol.* **77(1)**: 142-56.
- EZIN, A. M.; FRASER, S. E. & BRONNER-FRASER, M. (2009). Fate map and morphogenesis of presumptive neural crest and dorsal neural tube. *Dev. Biol.* **330(2)**: 221-36.

- GAJDUSEK, D. C. (1997). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* **197**: 943-60.
- GANS, C. & NORTH CUTT, R. G. (1983). Neural crest and the origins of the vertebrates: a new head. *Science* **220**: 268-74.
- GARCEZ, R. C.; TEIXEIRA, B. L.; DOS SANTOS SCHMITT, S.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. (2009). Epidermal growth factor (EGF) promotes the *in vitro* differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* **In press**.
- GARCÍA-CASTRO, M. I.; MARCELLE, C. & BRONNER-FRASER, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* **297**: 848-51.
- GILBERT, S. F. (2000). Developmental Biology. Sunderland, MA: *Sinauer Associates* **6ed**.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; FORLENZA, O. V.; CABRAL, A. L. VEIGA, S. S.; JULIANO, M. A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R. (2000a). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **76(1)**: 85-92.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R.; JAY, D. G.; BRENTANI, R. R. (2000b). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* **482(3)**: 257-60.
- HAJJ, G. N.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; SANTOS, T. G.; RIBEIRO, K. C.; JULIANO, M. A.; JACCHIERI, S. G.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R. (2007). Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J. Cell Sci.* **120(11)**: 1915-26.
- HALL, B. K. (2000). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol. Dev.* **2**: 3-5.
- HOLLAND, P. W. H. & GRAHAM, A. (1995). Evolution of regional identity in the vertebrate nervous system. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **3**: 17-27.
- HUANG, E. J. & REICHARDT, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* **24**: 677-736.

- IDO, A. & ITO, K. (2006). Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest by FGF2 treatment. *Dev. Dyn.* **235(2)**: 361-7.
- KEYNES, R. J. & STERN, C. D. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature* **310**: 786-89.
- KNIGHT, R. S. & WILL, R. G. (2004). Prion diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75(Suppl 1)**: i36-i42.
- KRULL, C. E.; LANSFORD, R.; GALE, N. W.; COLLAZO, A.; MARCELLE, C.; YANCOPOULOS, G. D.; FRASER, S. E.; BRONNER-FRASER, M. (1997). Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr. Biol.* **7**: 571-80.
- LARGE, T. H.; WESKAMP, G.; HELDER, J. C.; RADEKE, M. J.; MISKO, T. P.; SHOOTER, E. M.; REICHARDT, L. F. (1989). Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* **(2)**: 1123-34.
- LÄSSLE, M.; BLATCH, G. L.; KUNDRA, V.; TAKATORI, T.; ZETTER, B. R. (1997). Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem.* **272(3)**: 1876-84.
- LEDOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131(19)**:4637-50.
- LEDOUARIN, N. M. & KALCHEIM, C. (1999). The Neural Crest. Cambridge, UK: *Cambridge University Press* **2ed**.
- LEDOUARIN, N. M.; ZILLER, C.; & COULY, G. F. (1993). Patterning of neural crest derivatives in avian embryo: *in vivo* and *in vitro* studies. *Dev. Biol.* **159(1)**: 24-49.
- LINDEN, R.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R. R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* **88(2)**: 673-728.
- LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R. M.; RIBEIRO, K. C.; BRENTANI, R. R.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. (2005). Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* **25(49)**: 11330-39.

- LORING, J.; GLIMELIUS, B. & WESTON, J. A. (1982). Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation in vitro. *Dev. Biol.* **90(1)**: 165-74.
- MANSON, J. C.; CLARKE, A. R. ; HOOPER, M. L. ; AITCHISON, L. ; MCCONNEL, I. HOPE, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* **8(2-3)**: 121-27.
- MARTINEZ-MORALES, J. R., MARTI, E., FRADE, J. M.; RODRIGUEZ-TEBAR, A. (1995). Developmentally regulated vitronectin influences cell differentiation, neuron survival and process outgrowth in the developing chicken retina. *Neuroscience* **68(1)**: 245-53.
- MARTINS, V. R.; BERALDO, F. H.; HAJJ, G. N.; LOPES, M. H.; LEE, K. S.; PRADO, M. A.; LINDEN, R. (2009). Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr. Issues Mol. Biol.* **12**: 63-86.
- MAXWELL, G. D. & FORBES, M. E. (1990). The phenotypic response of cultured quail trunk neural crest cells to a reconstituted basement membrane-like matrix is specific. *Dev. Biol.* **141(1)**: 233-7.
- MEULEMANS, D. & BRONNER-FRASER, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell.* **7**:291-99.
- MURPHY, M.; REID, K; FORD, M.; FURNESS, J. B.; BARTLETT, P. F. (1994). FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* **120**: 3519-28.
- NICO, P. B.; DE-PARIS, F.; VINADÉ, E. R.; AMARAL, O. B.; ROCKENBACH, I.; SOARES, B. L.; GUARNIERI, R.; WICHERT-ANA, L.; CALVO, F.; WALZ, R.; IZQUIERDO, I.; SAKAMOTO, A. C.; BRENTANI, R.; MARTINS, V. R.; BIANCHIN, M. M. (2005). Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res.* **162(2)**: 173-81.
- PERRIS, R.; VON BOXBERG, Y. & LÖFBERG, J. (1988). Local embryonic matrices determine region-specific phenotypes in neural crest cells. *Science* **241(4861)**: 86-9.
- PRUSINER, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(23)**: 13363-83.

- REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C; LEDOUARIN, N. M.; DUPIN, E. (2006). Clonally culture differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev. Biol.* **300(2)**: 656-69.
- RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W. & KEYNES, R. J. (1985). The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **90**: 437-55.
- SANTUCCIONE, A.; SYTNYK, V.; LESHCHYNS'KA, I.; SCHACHNER, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* **169(2)**: 341-54.
- SAUKA-SPENGLER, T. & BRONNER-FRASER, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9(7)**: 557-68.
- SEIFFERT, D., IRUELA-ARISPE, M. L., SAGE, E. H.; LOSKUTOFF, D. J. (1995). Distribution of vitronectin mRNA during murine development. *Dev. Dyn.* **203(1)**: 71-9.
- SHAH, N. M. & ANDERSON, D. J. (1997). Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(21)**: 11369-74.
- SHAH, N. M.; MARCHIONNI, M. A.; ISAACS, I.; STROOBANT, P.; ANDERSON, D. J. (1994). Glial growth factor restricts mammalian neural crest cells to a glial fate. *Cell* **77(3)**: 349-60.
- SHYU, W. C.; LIN, S. Z.; CHIANG, M. F.; DING, D. C.; LI, K. W.; CHEN, S. F.; YANG, H. I.; LI, H. (2005). Overexpression of PrP<sup>C</sup> by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J. Neurosci.* **25(39)**: 8967-77.
- SIEBER-BLUM, M. (1991). Role of the neurotrophic factors BDNF and NGF in the commitment of pluripotent neural crest cells. *Neuron* **6(6)**: 949-55.
- STEELE, A. D.; EMSLEY, J. G.; OZDINLER, P. H.; LINDQUIST, S.; MACKLIS, J. D. (2006). Prion protein (PrP<sup>C</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103(9)**: 3416-21.

- TEILLET, M. A.; KALCHEIM, C. & LEDOUARIN, N. M. (1987). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev. Biol.* **120**: 329-47.
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 131-42.
- TOBLER, I.; GAUS, S. E.; DEBOER, T.; ACHERMANN, P.; FISCHER, M.; RÜLICHE, T.; MOSER, M.; OESCH, B.; MCBRIDE, P. A.; MANSON, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380(6575)**: 639-42.
- TOM, V. J.; DOLLER, C. M.; MALOUF, A. T.; SILVER, J. (2004). Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. *J. Neurosci.* **24(42)**: 9282-90.
- TREMBLAY, P.; BOUZAMONDO-BERNSTEIN, E.; HEINRICH, C.; PRUSINER, S. B.; DEARMOND, S. J. (2007). Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res.* **1139**: 60-7.
- TRENTIN, A.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LEDOUARIN, N. M.; DUPIN, E. (2004) Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(13)**: 4495-500.
- TURNER, S. G. & BRIDGMAN, P. C. (2005). Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity. *Nat. Neurosci.* **8(6)**: 717-19.
- WANG, H. U. & ANDERSON, D. J. (1997). Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* **18**: 383-96.
- ZANATA, S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; HAJJ, G. N.; CHIARINI, L. B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A. R.; CABRAL, A. L.; LEE, K. S.; JULIANO, M. A.; DE OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S. G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **21(13)**: 3307-16.
- ZHANG, C. C.; STEELE, A. D.; LINDQUIST, S.; LODISH, H. F. (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103(7)**: 2184-9.